

**LAPORAN AKHIR TAHUN
PENELITIAN TERAPAN UNGGULAN PERGURUAN TINGGI
(PTUPT)**



**POTENSI TANAMAN JOTANG (*SPILANTHES ACMELLA*)
SEBAGAI ANTIOSTEOPOROSIS: UJI AKTIVITAS PADA SEL
OSTEOBLAS DAN OSTEOKLAS *IN VITRO* SERTA ISOLASI
SENYAWA KANDUNGAN DIDALAMNYA**

TAHUN KE – 1 DARI RENCANA 2 TAHUN

Rr. RETNO WIDYOWATI, S.Si., M.Pharm., Ph.D., Apt.0005017701
Dr. WIWIED EKASARI., M.Si., Apt 0022045004
NENY PURWITASARI, S.Farm., M.Sc., Apt 0019048006

DIBIAYAI OLEH:
DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
SESUAI DENGAN KONTRAK PENELITIAN
NOMOR: 004/ADD/SP2H/LT/DRPM/VIII/2017

UNIVERSITAS AIRLANGGA
OKTOBER 2017

HALAMAN PENGESAHAN

Judul : POTENSI TANAMAN JOTANG (SPILANTHES
ACMELLA) SEBAGAI ANTIOSTEOPOROSIS: UJI
AKTIVITAS PADA SEL OSTEOKLAS DAN
OSTEOKLAS IN VITRO SERTA ISOLASI SENYAWA
KANDUNGAN DIDALAMNYA

Peneliti/Pelaksana
Nama Lengkap : RR RETNO WIDYOWATI, S.Si, Ph.D, Apt
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga
NIDN : 0005017701
Jabatan Fungsional : Lektor
Program Studi : Pendidikan Apoteker
Nomor HP : 081615886978
Alamat surel (e-mail) : rr-retno-w@ff.unair.ac.id

Anggota (1)
Nama Lengkap : Dr. Dra WIWIED EKASARI M.Si, Apt
NIDN : 0022016902
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

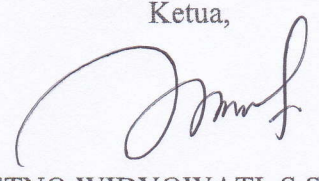
Anggota (2)
Nama Lengkap : NENY PURWITASARI S.Farm, M.Sc.
NIDN : 0019048006
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Institusi Mitra (jika ada)
Nama Institusi Mitra : -
Alamat : -
Penanggung Jawab : -
Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 1 dari rencana 2 tahun
Biaya Tahun Berjalan : Rp 99,770,000
Biaya Keseluruhan : Rp 210,000,000

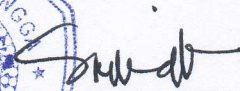
Mengetahui,
Dekan Fakultas Farmasi Unair,

(Dr. Chir Athiyah, MS., Apt)
NIP/NIK 195604071981032001

Kota Surabaya, 8 - 11 - 2017
Ketua,


(RR RETNO WIDYOWATI, S.Si, Ph.D, Apt)
NIP/NIK 197701052002122002

Menyetujui,
Sekretaris LPI Unair


(Dr. Ir. Sri Hidanah, M.S)
NIP/NIK 196108031986012001

RINGKASAN

POTENSI TANAMAN JOTANG (*SPILANTHES ACMELLA*) SEBAGAI ANTIOSTEOPOROSIS: UJI AKTIVITAS PADA SEL OSTEOLAS DAN OSTEOCLAS IN VITRO SERTA ISOLASI SENYAWA KANDUNGAN DIDALAMNYA

Indonesia mempunyai kekayaan hayati yang melimpah, salah satunya adalah tanaman obat. Pemanfaatan tanaman obat Indonesia masih belum optimal. Jotang, *Spilanthus acmella*, adalah salah satu tanaman obat Indonesia yang mempunyai kandungan senyawa aktif berupa sesquiterpen, flavonoid dan polifenol yang berpotensi sebagai obat gusi berdarah dan sakit gigi (bunga), obat diare (akar), analgesik lokal (akar; spilanthol) dan obat rematik. Penentuan aktivitas anti-osteoporosis baik ekstrak etanol 70%, fraksi heksan, etil asetat, butanol dan air maupun isolat/senyawa dari tanaman tersebut perlu dilakukan untuk meningkatkan derajat kesehatan masyarakat. Penelitian ini dirancang selama dua tahun. Pada tahun pertama bertujuan untuk (1) mengetahui aktivitas anti-osteoporosis ekstrak etanol 70%, fraksi heksan, etil asetat, butanol dan air dari *Spilanthus acmella*, terhadap peningkatan pembentukan masa tulang (sel osteoblast) dan penghambatan masa tulang (sel osteoklas), (2) mengetahui fraksi aktif yang mempunyai aktivitas anti-osteoporosis (formasi dan resorpsi) dalam tanaman tersebut, (3) mengetahui senyawa kandungan di dalam tanaman tersebut, senyawa aktif dan baru yang dapat menambah perbendaharaan senyawa kimia dalam tanaman Indonesia. Pada tahun kedua akan dilakukan uji toksisitas dan pembuatan sediaan (kapsul) yang diharapkan bisa menghasilkan produk yang inovatif.

Pada penelitian ini telah dilakukan ekstraksi dengan menggunakan pelarut etanol 70%, kemudian dilanjutkan dengan fraksinasi. Baik ekstrak maupun fraksi tersebut dilakukan uji aktivitas anti-osteoporosis *in vitro* terhadap peningkatan aktivitas sel osteoblas (formasi tulang). Fraksi yang mempunyai aktivitas paling baik merupakan fraksi aktif. Kemudian pada fraksi aktif terpilih ini dilakukan isolasi senyawa kandungan di dalamnya untuk mengetahui senyawa marker dari fraksi potensial tersebut. Isolat senyawa tersebut juga dilakukan uji aktivitas anti-osteoporosis *in vitro* (peningkatan sel osteoblast). Dengan diketahuinya efek-efek tersebut dari tanaman ini, diharapkan dapat mengungkap potensi *Spilanthus acmella* sebagai obat untuk penyakit osteoporosis baik melalui peningkatan pembentukan masa tulang (formasi tulang) sehingga *remodeling* tulang dalam tubuh dapat berjalan semestinya.

PRAKATA

Puji syukur ke hadapan Tuhan Yang Maha Esa, bahwa atas berkat dan rahmatNya kami mendapatkan kesempatan untuk melaksanakan Penelitian Terapan Unggulan Perguruan Tinggi yang berjudul: **“POTENSI TANAMAN JOTANG (*SPILANTHES ACMELLA*) SEBAGAI ANTIOSTEOPOROSIS: UJI AKTIVITAS PADA SEL OSTEOLAS DAN OSTEOKLAS IN VITRO SERTA ISOLASI SENYAWA KANDUNGAN DIDALAMNYA”**. Penelitian tersebut diperlukan untuk memberikan landasan ilmiah pada pemakaian tanaman dari *Spilanthes amella* sebagai obat antiosteoporosis yang sudah berlangsung secara turun temurun di kalangan masyarakat.

Oleh karena itu, maka bersama ini kami menyampaikan ucapan terima kasih atas kesempatan yang sudah kami peroleh kepada:

1. DP2M Dikti atas bantuan dana Penelitian Terapan Unggulan Perguruan Tinggi sehingga penelitian ini dapat terlaksana
2. Ketua LPPM Universitas Airlangga atas kesempatan yang diberikan untuk melakukan penelitian ini
3. Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang senantiasa memberikan fasilitas dan kesempatan kepada para staf pengajar untuk melakukan penelitian.

Kami berharap agar hasil penelitian ini bermanfaat bagi pengembangan dunia pengobatan untuk pemberantasan penyakit degeneratif. Pemberantasan penyakit tersebut merupakan persyaratan yang harus dipenuhi bagi tercapainya cita-cita masyarakat Indonesia sehat jasmaniah dan rohaniyah.

Terima kasih.

Ketua Peneliti

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN PENGESAHAN	ii
RINGKASAN	iii
PRAKATA	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR.....	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
BAB I. PENDAHULUAN	1
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	6
BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN.....	15
BAB IV. METODE PENELITIAN.....	16
BAB V. HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI	19
BAB VI. RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA	24
BAB VII. KESIMPULAN.....	26
DAFTAR PUSTAKA.....	27
LAMPIRAN	29

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1.1 Rencana target capaian tahunan.	4
Tabel 5.1 Hasil fraksinasi dari ekstrak etanol 70% <i>Spilanthes acmella</i>	19
Tabel 6.1. Rencana kegiatan penelitian yang akan dilakukan pada tahun berikutnya	25

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1. <i>Spilanthès acmella</i>	6
Gambar 2.2. Proses pembentukan tulang kembali (remodeling).....	9
Gambar 4.1. Bagan alur penelitian	16
Gambar 5.1. Peningkatan aktivitas enzim ALP dari ekstrak etanol 70% <i>Spilanthès acmella</i>	20
Gambar 5.2. Peningkatan aktivitas enzim ALP dari fraksi-fraksi <i>Spilanthès acmella</i>	20
Gambar 5.3. Struktur dari senyawa dalam fraksi butanol <i>Spilanthès acmella</i>	22
Gambar 5.4. Peningkatan aktivitas enzim ALP dari senyawa terhadap sel osteoblast MC3T3-E1	23
Gambar 6.1. Roadmap penelitian selama 2 tahun	24

LAMPIRAN

Lampiran 1. Abstrak ICONPROBIOS 2017	29
Lampiran 2. Submit artikel internasional di Chemical and Pharmaceutical Bulletin	32
Lampiran 3. Draft artikel nasional yang akan di submit (Jurnal Bahan Alam Indonesia)	48
Lampiran 4. Draft paten.....	54

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar belakang

Osteoporosis adalah penyakit tulang sistemik yang ditandai oleh penurunan densitas masa tulang dan perburukan mikroarsitektur tulang sehingga tulang menjadi rapuh dan mudah patah (Jennifer, 2008). Dengan meningkatnya usia harapan hidup, maka berbagai penyakit degeneratif dan metabolik, termasuk osteoporosis akan menjadi permasalahan muskuloskeletal yang memerlukan perhatian khusus, terutama di negara-negara berkembang. Sejak dicanangkannya *Bone Joint Decade* (BJD) 2000-2010 osteoporosis menjadi penting, karena selain termasuk dalam 5 besar masalah kelainan muskuloskeletal yang harus ditangani, juga kasusnya semakin meningkat sejalan dengan peningkatan jumlah usia tua (Irwan, 2008). Pada umumnya pengobatan osteoporosis dibagi menjadi 2 bagian yaitu untuk menghambat hilangnya masa tulang (anti-resorpsi) dan meningkatkan masa tulang (formasi tulang) (NIH, 2001). Permasalahan terapi osteoporosis adalah kompleks dan erat hubungannya dengan cakupan penderita yang rendah akibat mahal biaya deteksi dini, pemeriksaan lanjutan dan obat-obatan untuk penyakit osteoporosis. Selain itu obat-obatan yang ada pun masih belum ada yang ideal karena masalah efikasi dan toleransi yang ditimbulkan oleh obat-obatan tersebut.

Dewasa ini pengobatan osteoporosis banyak dilakukan dengan menggunakan terapi anti-resorpsi, seperti golongan raloxifen (estrogen reseptor modulator), golongan bisfosfonat (alendranat, risedronat, ibandronat) dan kalsitonin. Meskipun mekanisme aksi dari masing-masing golongan ini berbeda, penghambatan sel osteoklas sebagai mediator dari resorpsi tulang merupakan tujuan akhir yang diinginkan (Fleisch, 1998), tapi dikarenakan efek samping yang sering terjadi, banyak pasien yang menghentikan terapinya (Mashiba *et al.*, 2005; Whyte *et al.*, 2003; Woo *et al.*, 2006).

Upaya penanggulangan penyakit osteoporosis terus dilakukan terutama pencarian obat anti-osteoporosis baru. Saat ini trend pengobatan masyarakat mengarah pada bahan alam atau *back to nature*. Pengobatan dengan bahan alam dipercaya masyarakat memiliki efek samping lebih ringan dan relatif mudah didapat dipasaran. Pada penelitian sebelumnya telah dilakukan skrining dari 32 tanaman Indonesia terhadap aktivitas dari alkaline fosfatase (ALP) sebagai marker dari

diferensiasi osteoblas dan diperoleh hasil bahwa ekstrak etanol 70% dari *Barleria lupulina*, *Graptophyllum pictum*, dan *Spilanthes acmella* menstimulasi aktivitas ALP sebesar 139%, 128% dan 169% (Retno, 2010). ALP mengkatalisis ester monofosfat yang berada di dalam membran plasma menjadi *phosphatidyl-glycolipid anchor* yang akan mempengaruhi proses pembentukan masa tulang kembali (Franceschi & Young, 1990). Ekstrak etanol 70% tanaman ini dikombinasikan dengan latihan fisik dapat meningkatkan jumlah sel osteoblas secara bermakna bila dibandingkan dengan hanya ekstrak etanol atau latihan fisik saja (Hening *et al.*, 2015).

Ekstrak etanol 70% dari *Spilanthes acmella* berpotensi digunakan untuk pengobatan osteoporosis karena mampu meningkatkan pembentukan masa tulang dengan menstimulasi aktivitas dari enzim alkaline fosfatase (Retno, 2010), dan meningkatkan aktivitas sel osteoblas pada tulang trabekula proksimal femur pada mencit jantan sebagai model osteoporosis dengan induksi deksametason (Hening *et al.*, 2015). Dengan diketahuinya efek-efek tersebut dari tanaman ini, diharapkan dapat mengungkap potensi *Spilanthes acmella* sebagai obat untuk penyakit osteoporosis baik melalui peningkatan pembentukan masa tulang (formasi tulang) maupun melalui penghambatan masa tulang (anti-resorpsi) sehingga *remodeling* tulang dalam tubuh dapat berjalan semestinya. Selain itu kajian tentang senyawa aktif dalam *Spilanthes acmella* sebagai anti-osteoporosis juga belum banyak dilaporkan, sehingga penelitian ini penting untuk dikembangkan.

1.2. Urgensi (keutamaan) penelitian

Indonesia memiliki lebih kurang 30.000 jenis tanaman obat, namun hanya 1000 jenis tanaman yang telah dimanfaatkan oleh masyarakat dalam upaya penyembuhan dan pencegahan suatu penyakit, peningkatan daya tahan tubuh dan pengembalian kesegaran tubuh (Pramono, 2007), sehingga pemanfaatan tanaman obat sebagai obat tradisional maupun modern masih terbuka lebar. Kesempatan ini menjadi penting karena akhir-akhir ini kecenderungan masyarakat memilih obat tradisional dari bahan alam “*Back to Nature*”. Obat tradisional juga memiliki efek samping yang lebih kecil dibandingkan obat modern jika digunakan dengan tepat. Tanaman yang digunakan sebagai obat tradisional dapat memiliki lebih dari satu efek farmakologi sehingga dalam ramuan obat tradisional dapat terjadi efek

komplementer atau sinergisme antar senyawa obat, sehingga penting untuk mengetahui jenis senyawa aktif untuk suatu pengobatan.

Saat ini permasalahan osteoporosis di Indonesia telah mencapai pada tingkat yang perlu diwaspadai karena jumlah penderita osteoporosis ini jauh lebih besar dari data terakhir Depkes yang mematok angka 19.7% dari seluruh penduduk dengan alasan perokok di Indonesia masuk dalam urutan ke-2 dunia setelah Cina. Selain itu jumlah usia lanjut di Indonesia diperkirakan akan naik 14% dalam kurun waktu 1990-2025, sedangkan perempuan menopause pada tahun 2000 diperhitungkan 15,5 juta akan naik menjadi 24 juta pada tahun 2015. Penelitian Roeshadi di Jawa Timur mendapatkan hasil bahwa puncak masa tulang dicapai pada usia 30-34 tahun dan rata-rata kehilangan masa tulang pascamenopause adalah 1,4% per tahun. Penelitian yang dilakukan di klinik Reumatologi RSCM mendapatkan hasil bahwa faktor resiko osteoporosis yang meliputi usia, lamanya menopause dan kadar estrogen yang rendah, sedangkan faktor proteksinya adalah kadar estrogen yang tinggi, riwayat berat badan lebih atau obesitas dan latihan yang teratur ([Sudoyo & Simadibrata, 2006](#)). Bayangkan betapa besar jumlah penduduk yang dapat terancam penyakit osteoporosis. Terapi penyakit osteoporosis dengan menggunakan anti-resorpsi, seperti golongan raloxifen (estrogen reseptor modulator), golongan bisfosfonat (alendranat, risedronat, ibandronat) dan kalsitonin memberikan efek samping yang tidak diinginkan dan tidak nyaman, sehingga banyak pasien yang menghentikan terapinya ([Mashiba et al., 2005](#); [Whyte et al., 2003](#); [Woo et al., 2006](#)).

Upaya penanggulangan penyakit osteoporosis terus dilakukan terutama pencarian alternatif obat anti-osteoporosis baru. Salah satu tanaman obat Indonesia yang mempunyai banyak khasiat adalah *Spilanthes acmella*. Kandungan tanaman dari *Asteraceae* ini mampu meningkatkan aktivitas pembentukan tulang (*bone formation*) melalui peningkatan aktivitas enzim alkaline fosfatase baik ekstrak etanol 70% maupun fraksi heksan, etil asetat, butanol dan air secara *in vitro* ([Retno, 2010](#)) dan peningkatan sel osteoblas pada tulang trabekula proksimal femur dari mencit jantan sebagai model osteoporosis dengan penginduksi deksametason *in vivo* ([Hening et al., 2015](#)). Oleh karena itu perlu dilanjutkan penelitian terhadap aktivitas penghambatan masa tulang (resorpsi tulang) sehingga mekanisme kerja dari dua

efek yang berbeda tapi saling mendukung kekuatan dari tulang dapat menjadikan terobosan baru untuk pengobatan penyakit osteoporosis.

Dari uraian di atas dapat disimpulkan bahwa nilai penting yang akan didapatkan dalam penelitian yang diusulkan ini adalah: (1) menyediakan alternatif pengobatan untuk penyakit osteoporosis dengan pemanfaatan sumber daya alam Indonesia dari tanaman *Spilanthus acmella*, (2) menyediakan alternatif fraksi/senyawa bioaktif untuk anti-osteoporosis dari tanaman *Spilanthus acmella*, (3) diperoleh senyawa anti-osteoporosis hasil eksplorasi sumber daya alam Indonesia yang dapat diproduksi dan dipasarkan di Indonesia, (4) meningkatkan derajat kesehatan masyarakat serta mendukung upaya pengobatan penyakit osteoporosis, (5) menunjang payung penelitian tentang eksplorasi bahan aktif anti-osteoporosis dari bahan alam tanaman obat Indonesia di Universitas Airlangga.

Tabel 1.1. Capaian Tahunan

No	Jenis Luaran		Indikator Capaian	
			TS ¹⁾	TS ²⁾
1.	Publikasi	Internasional	Submitted	Published
		Nasional Terakreditasi	Draft	Published
2.	Pemakalah dalam temu ilmiah	Internasional	Terlaksana	Terlaksana
		Nasional	Terdaftar	Terlaksana
3.	Invited speaker dalam temu ilmiah	Internasional	Tidak ada	Tidak ada
		Nasional	Tidak ada	Tidak ada
4.	Visiting lecturer	Internasional	Terdaftar	Terlaksana
5.	Hak Kekayaan Intelektual (HKI)	Paten	Draft	Registered
		Paten sederhana	Tidak ada	Tidak ada
		Hak cipta	Tidak ada	Tidak ada
		Merek dagang	Tidak ada	Tidak ada
		Rahasia dagang	Tidak ada	Tidak ada
		Desain produk industri	Tidak ada	Tidak ada
		Indikasi geografis	Tidak ada	Tidak ada
		Perlindungan varietas tanaman	Tidak ada	Tidak ada
		Perlindungan topografi sirkuit terpadu	Tidak ada	Tidak ada
6.	Teknologi Tepat Guna		Tidak ada	Tidak ada
7.	Model/Purwarupa/Desain/Karya seni/Rekayasa sosial		Tidak ada	Ada (produk OHT)
8.	Buku Ajar (ISBN)		Tidak ada	Tidak ada
9.	Tingkat Kesiapan Teknologi (TKT)		3	4

Penelitian isolasi bahan aktif anti-osteoporosis dari *Spilanthes acmella* juga relatif baru, mengingat di Indonesia penelitian yang mengungkap tentang senyawa aktif anti-osteoporosis dari bahan alam belum banyak dilaporkan. Dari segi potensi aplikasi, penelitian ini relevan dengan kebutuhan pemerintah dalam mengatasi kelangkaan bahan baku obat dari bahan alam.

Hasil penelitian ini akan dipublikasikan pada jurnal internasional yang terindeks scopus (Chemical and Pharmaceutical Bulletin) dan jurnal nasional yang terakreditasi (Jurnal Bahan Alam Indonesia). Selain itu, penelitian ini juga akan terlibat dalam konferensi atau seminar internasional dan seminar nasional yang ada di Indonesia. Target dari penelitian ini tergambar seperti pada tabel 1.1.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tinjauan tentang jotang (*Spilanthes acmella*)

Spilanthes acmella Murr. termasuk ke dalam famili Asteraceae, juga dikenal sebagai tumbuhan penyembuh sakit gigi, rematik dan demam, disentri, luka gigitan ular, antiseptik, antibakteri, antijamur, influenza, batuk dan stomatitis. Tumbuhan ini merupakan tanaman semak berukuran 30-60 cm. Tanaman ini merupakan tumbuhan asli daerah tropis seperti India, Brazil dan Indonesia. Bagian dari tumbuhan ini yaitu akar, batang, daun dan bunganya digunakan oleh sebagian masyarakat sebagai obat tradisional. Seperti bunganya sebagai obat gusi berdarah dan sakit gigi. Bagian yang lain seperti akar bisa digunakan sebagai obat diare. Akar, putik bunga dan bagian lainnya mengandung senyawa yang dikenal dengan nama “spilanthol” dan “acmellonate” yang merupakan stimulan yang sangat kuat dan bersifat analgesik lokal. Selain itu juga mengandung fenol, kumarin dan triterpenoid. Tumbuhan ini telah diaplikasikan dalam bidang farmasi, anti sakit gigi, obat kumur dan obat rematik. Sebagai suplemen nutrisi sejumlah kecil ekstrak tumbuhan telah digunakan sebagai pemanis yang tidak mempengaruhi bau makanan dan minuman (Supaluk *et al.*, 2009).



Gambar 2.1. *Spilanthes acmella* (<http://aoki2.si.gunma-u.ac.jp>)

Famili Asteraceae merupakan salah satu famili tumbuhan yang tersebar luas dengan 30.000 spesies dan lebih dari 1100 genus. Kebanyakan tumbuhan ini mengandung aktivitas antimikroba yang dihasilkan oleh senyawa sesquiterpen (metabolit sekunder). Selain itu Asteraceae juga mengandung senyawa kimia lain

seperti polifenol dan flavonoid. Salah satu Famili Asteraceae yang sudah diteliti adalah tumbuhan Jombang (*Taraxacom Officinale* Weber et Wiggers). Herba dari tanaman ini mengandung flavonoid (isoquerin dan hyperin), taraxasterol, taraxacerin, taraxerol, taraxin, kolin, inulin, pektin, kumesterol, asparagin dan vitamin (A, B dan D). Inulin adalah oligosakarida yang mempunyai khasiat prebiotik. Akar mengandung taraxol, taraxerol, taraxin, taraxa sterol, β -amyrin, stigmasterol, β -sitosterol, kolin, levolin, pektin, inulin, kalsium, kalium, glukosa, dan fruktosa. Daun mengandung lutein, violaxantin, plaslokuinon, tanin, karotenoid, kalium, natrium, kalsium, kuper, zat besi, magnesium, fosfor, silikon, sulfur, dan vitamin (A, B1, B2, C dan D). Bunga mengandung arnidol dan flavoxantin.

Ekstrak etanol 70% tanaman ini menstimulasi aktivitas enzim alkaline fosfatase (ALP) sebesar 169% (Retno, 2010) dan meningkatkan jumlah sel osteoblas pada tulang trabekula proksimal femur pada mencit jantan sebagai model osteoporosis dengan induksi deksametason (Hening *et al.*, 2015).

2.2. Tinjauan tentang osteoporosis

Osteoporosis merupakan salah satu penyakit serius yang berhubungan dengan usia lanjut, penyakit ini dapat menyebabkan patah tulang yang sering terjadi pada pinggul dan punggung, juga menyebabkan nyeri kronis, kehilangan keseimbangan dan dapat menimbulkan kematian.

Insiden osteoporosis lebih tinggi pada wanita dibandingkan laki-laki dan merupakan problem pada wanita pascamenopause. Osteoporosis di klinik menjadi penting karena problem fraktur tulang, baik fraktur yang disertai trauma yang jelas maupun fraktur yang terjadi tanpa disertai trauma yang jelas.

Penelitian Roeshadi di Jawa Timur mendapatkan hasil bahwa puncak masa tulang dicapai pada usia 30-34 tahun dan rata-rata kehilangan masa tulang pascamenopause adalah 1,4% per tahun. Penelitian yang dilakukan di klinik Reumatologi RSCM mendapatkan faktor resiko osteoporosis yang meliputi usia, lamanya menopause dan kadar estrogen yang rendah, sedangkan faktor proteksinya adalah kadar estrogen yang tinggi, riwayat berat badan lebih atau obesitas dan latihan yang teratur (Irwan, 2008).

Ada 2 penyebab utama osteoporosis, yaitu pembentukan masa puncak tulang yang kurang baik selama masa pertumbuhan dan meningkatnya pengurangan masa tulang

setelah menopause. Masa tulang meningkat secara konstan dan mencapai puncak sampai usia 40 tahun, pada wanita lebih muda sekitar 30-35 tahun. Walaupun demikian tulang yang hidup tidak pernah beristirahat dan akan selalu mengadakan remodeling dan memperbaharui cadangan mineralnya sepanjang garis beban mekanik. Faktor pengatur formasi dan resorpsi tulang dilaksanakan melalui 2 proses yang selalu berada dalam keadaan seimbang dan disebut *coupling*. Proses *coupling* ini memungkinkan aktivitas formasi tulang sebanding dengan aktivitas resorpsi tulang. Proses ini berlangsung 12 minggu pada orang muda dan 16-20 minggu pada usia menengah atau lanjut. *Remodelling rate* adalah 2-10% masa skelet per tahun (Stevenson & Marsh, 2007).

Proses *remodelling* ini dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu faktor lokal yang menyebabkan terjadinya satu rangkaian kejadian pada konsep *Activation – Resorption – Formation* (ARF). Proses ini dipengaruhi oleh protein mitogenik yang berasal dari tulang yang merangsang preosteoblas supaya membelah menjadi osteoblas akibat adanya aktivitas resorpsi oleh osteoklas. Faktor lain yang mempengaruhi proses pembentukan tulang kembali (remodeling) adalah faktor hormonal. Proses ini akan ditingkatkan oleh hormon paratiroid, hormon pertumbuhan dan $1,25(\text{OH})_2$ vitamin D. Sedang yang menghambat proses ini adalah kalsitonin, estrogen dan glukokortikoid. Proses-proses yang mengganggu remodeling tulang inilah yang menyebabkan osteoporosis (Stevenson & Marsh, 2007).

Selain gangguan pada proses remodeling tulang faktor lainnya adalah pengaturan metabolisme kalsium dan fosfat. Walaupun terdapat variasi asupan kalsium yang besar, tubuh tetap memelihara konsentrasi kalsium serum pada kadar yang tetap. Pengaturan homeostasis kalsium serum dikontrol oleh organ tulang, ginjal dan usus melalui pengaturan paratiroid hormon (PTH), hormon kalsitonin, kalsitriol ($1,25(\text{OH})_2$ vitamin D) dan penurunan fosfat serum. Faktor lain yang berperan adalah hormon tiroid, glukokortikoid dan insulin, vitamin C dan inhibitor mineralisasi tulang (pirofosfat dan pH darah). Pertukaran kalsium sebesar 1,000 mg/harinya antara tulang dan cairan ekstraseluler dapat bersifat kinetik melalui fase formasi dan resorpsi tulang yang lambat. Absorpsi kalsium dari gastrointestinal yang efisien tergantung pada asupan kalsium harian, status vitamin D dan umur. Didalam darah absorpsi tergantung kadar protein tubuh, yaitu albumin, karena 50% kalsium yang diserap oleh tubuh terikat oleh albumin, 40% dalam bentuk kompleks sitrat dan 10% terikat fosfat.

Dalam terapi hal yang perlu diperhatikan adalah mengenali klasifikasi osteoporosis dari penderita. Osteoporosis dibagi 3 (Stevenson & Marsh, 2007), yaitu:

1. Osteoporosis primer

Osteoporosis ini berhubungan dengan kelainan pada tulang, yang menyebabkan peningkatan proses resorpsi di tulang trabekula sehingga meningkatkan resiko fraktur vertebra dan Colles. Pada usia dekade awal pasca menopause, wanita lebih sering terkena daripada pria dengan perbandingan 6-8: 1 pada usia rata-rata 53-57 tahun.

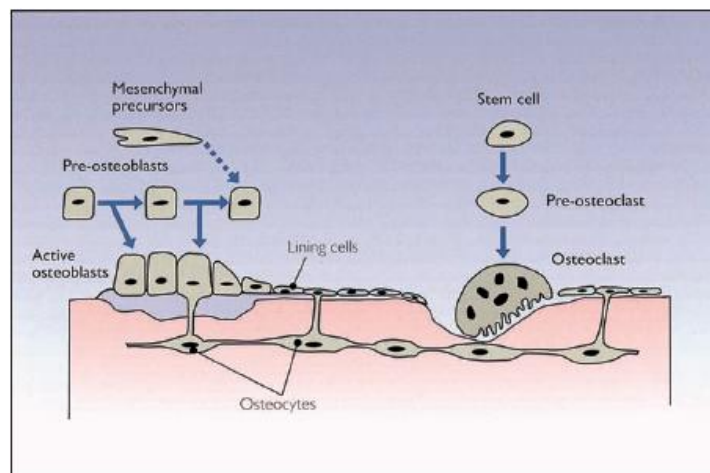
2. Osteoporosis sekunder

Osteoporosis ini disebabkan oleh penyakit atau sebab lain di luar tulang.

3. Osteoporosis idiopatik

Osteoporosis ini terjadi pada laki-laki yang lebih muda dan pemuda pramenopause dengan faktor etiologik yang tidak diketahui.

Pembentukan ulang tulang adalah suatu proses yang terus menerus. Pada osteoporosis, masa tulang berkurang, yang menunjukkan bahwa laju resorpsi tulang pasti melebihi laju pembentukan tulang. Pembentukan tulang lebih banyak terjadi pada korteks (Stevenson & Marsh, 2007).



Gambar 2.2. Proses pembentukan tulang kembali (remodeling) (Stevenson & Marsh, 2007)

Dewasa ini pengobatan osteoporosis banyak dilakukan menggunakan terapi antiresorpsi, seperti golongan raloxifen (estrogen reseptor modulator), golongan bisfosfonat (alendranat, risedronat, ibandronat) dan kalsitonin. Meskipun mekanisme

aksi dari masing-masing golongan ini berbeda, penghambatan sel osteoklas sebagai mediator dari resorpsi tulang merupakan tujuan akhir yang diinginkan, tapi dikarenakan efek samping yang sering terjadi, banyak pasien yang menghentikan terapinya (Wronski *et al.*, 1988; Mashiba *et al.*, 2005; Whyte *et al.*, 2003; Woo *et al.*, 2006).

Sebaliknya pengobatan osteoporosis menggunakan terapi formasi tulang (anabolik) yang berhubungan langsung dengan proses pembentukan tulang dapat mereduksi terjadinya patah tulang dengan cara meningkatkan kualitas tulang dan masa tulang. Dengan menggunakan terapi ini, densitas dan turnover tulang akan meningkat, mikro-arsitektur tulang juga meningkat dan ukuran tulang akan berubah. Sel osteoblast mempunyai peran yang sangat besar dalam pembentukan tulang melalui proliferasi dan diferensiasinya. Khususnya pada diferensiasi dari sel osteoblas, menunjukkan rigiditas dan kekuatan dari tulang dalam mempertahankan ke-elastisannya. Dewasa ini golongan anabolik yang menjanjikan adalah paratiroid hormon (PTH) (Girotra *et al.*, 2006). Tapi terapi menggunakan PTH ini harus dilakukan setiap hari secara injeksi, mempersulit pasien untuk melakukannya sendiri.

Terapi pada osteoporosis harus mempertimbangkan 2 hal, yaitu terapi pencegahan yang pada umumnya bertujuan untuk menghambat hilangnya masa tulang. Dengan cara yaitu memperhatikan faktor makanan, latihan fisik (senam pencegahan osteoporosis), pola hidup yang aktif dan paparan sinar ultra violet. Selain itu juga menghindari obat-obatan dan jenis makanan yang merupakan faktor resiko osteoporosis seperti alkohol, kafein, diuretika, sedatif, kortikosteroid. Selain pencegahan, tujuan terapi osteoporosis adalah meningkatkan masa tulang dengan melakukan pemberian obat-obatan antara lain hormon pengganti (estrogen dan progesteron dosis rendah). Kalsitrol, kalsitonin, bifosfat, raloxifene, dan nutrisi seperti kalsium serta senam beban. Pembedahan pada pasien osteoporosis dilakukan bila terjadi fraktur, terutama bila terjadi fraktur panggul (Irwan, 2008).

2.3. Uji aktivitas peningkatan ALP dari sel osteoblas

Pengobatan osteoporosis meliputi penghambatan aktivitas osteoklas atau peningkatan aktivitas osteoblas. Osteoblast merupakan fibroblas khusus yang dapat mengeluarkan dan menambah jumlah mineral pada matrik tulang. Diferensiasi osteoblas secara *in vitro* dan *in vivo* dibedakan menjadi 3 tahap, yaitu (a) proliferasi sel, (b)

pematangan matrik and (c) mineralisasi matrik. Selama proses proliferasi, beberapa ekstraselular matrik dari protein terdeteksi (procollagen I, TGF- β , dan fibronectin). Pematangan matrik ditandai dengan ekspresi maksimal dari alkaline fosfatase (ALP). Awal dari proses mineralisasi ditandai dengan ekspresi gen seperti OC, BSP dan OPN dan akhirnya proses mineralisasi telah selesai. Sel osteoblas MC3T3-E1 mampu melakukan proses diferensiasi menjadi osteoblas. Selama proses diferensiasi terjadi peningkatan aktivitas ALP yang diikuti oleh matrik ekstraselular (ECM) dan menghasilkan mineralisasi. Jadi peningkatan pertumbuhan sel MC3T3-E1 menunjukkan peningkatan ALP dan mineralisasi yang menyebabkan proses proliferasi dan diferensiasi terjadi sehingga terjadi peningkatan proses pembentukan tulang ([Kostenuik et al., 1999](#)).

2.4. Uji aktivitas penghambatan sel osteoklast

Osteoclas merupakan sel raksasa yang berinti dan diferensiasi dari sel makrofag hematopoietik yang dipengaruhi oleh receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) dan macrophage monocyte colony-stimulating factor (M-CSF). Osteoclasts berperan penting dalam pengembangan penyakit osteoporosis, inflamasi, artritis and rematik. Penurunan kekuatan tulang mempengaruhi aktivitas osteoklas yang berhubungan dengan sinovial fibroblas dan sel T helper dari RANKL ([Oshita et al., 2011](#)).

2.5. Ekstraksi

Ekstraksi adalah suatu proses pemisahan substansi dari campurannya dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Penggunaan ekstraksi yang tepat bergantung pada bahan yang diekstraksi dan pada jenis senyawa yang diisolasi.

Berdasarkan proses pelaksanaannya ada dua macam ekstraksi, yaitu: (1) ekstraksi berkesinambungan, pelarut yang sama dipakai secara berulang-ulang sampai proses selesai, contohnya sokhlet, (2) ekstraksi bertahap, selalu dipakai pelarut baru pada setiap tahapnya sampai proses selesai, contohnya maserasi dan perkolasi ([Harbone, 1987](#)).

Berdasarkan bentuk campuran yang diekstraksi dapat dibedakan menjadi: (1) ekstrak padat-cair, adalah proses ekstraksi yang paling banyak ditemui dalam dunia usaha, digunakan untuk mengisolasi senyawa berkhasiat yang terkandung

dalam bahan alam yang berbentuk padat, (2) ekstraksi cair-cair, adalah proses ekstraksi yang berdasarkan pada distribusi solut dalam dua macam pelarut yang tidak saling campur sehingga solut akan terbagi dalam kedua macam pelarut tersebut sampai dicapai suatu keadaan setimbang (Harbone, 1987).

2.6. Kromatografi

Kromatografi merupakan teknik pemisahan suatu campuran zat-zat kimia berdasarkan perbedaan distribusinya dalam fasa gerak (dapat berupa cair maupun gas) dan fasa diam (dapat berupa padat maupun cair). Dengan kromatografi, hampir setiap campuran kimia, mulai senyawa dengan berat molekul rendah sampai tinggi, dapat dipisahkan menjadi komponen-komponennya dengan beberapa metode kromatografi (Gritter *et al.*, 1991).

Ada beberapa macam metode kromatografi, yaitu kromatografi lapis tipis, kromatografi gas, kromatografi kolom, kromatografi vakum cair, kromatografi kolom cepat, dan sebagainya. Pemisahan dan pemurnian kandungan senyawa dalam tumbuhan dapat dilakukan dengan menggunakan salah satu dari metode kromatografi atau gabungan dari metode tersebut.

2.7. Roadmap penelitian

Pada penelitian sebelumnya telah dilaporkan kemampuan asam lemak yaitu asam oleat dan asam mead (5,8,11-*Eicostrienoic acid*, 20:3n-9) terhadap aktivitas sel osteoblas (enzim alkaline fosfatase), bahwa asam mead mampu meningkatkan aktivitas sel osteoblas setelah 6 dan 18 jam inkubasi (1-100 μ M), sedangkan asam oleat tidak memberikan aktivitas. Dari penelitian ini disimpulkan bahwa keberadaan asam lemak ini di *fetal cartilage* penting untuk pencegahan terjadinya proses kalsifikasi dimana proses pembentukan tulang terhambat (Tomohito *et.al.*, 2009).

Pada tahun 2007 telah dilaporkan juga bahwa kombinasi latihan fisik pembebanan aksial dan konsumsi daun semanggi dapat menghambat peningkatan kecepatan ketidakseimbangan remodeling tulang pada perempuan pascamenopause dan mencit betina *Mus musculus* (Laswati, 2007).

Telah juga dilakukan skrining dari 32 tanaman Indonesia terhadap aktivitas dari alkaline fosfatase (ALP) sebagai marker dari diferensiasi osteoblas dan diperoleh hasil bahwa ekstrak etanol 70% dari *Spilanthes acmella*, *Graptophyllum pictum*, dan *Barleria lupulina* menstimulasi aktivitas ALP sebesar 169%, 128% dan 139% (Retno, 2010). ALP mengkatalisis ester monofosfat yang berada di dalam membran plasma menjadi *phosphatidyl-glycolipid anchor* yang akan mempengaruhi proses pembentukan masa tulang kembali (Franceschi & Young, 1990).

Selain itu juga telah dilakukan proses pemisahan ekstrak etanol 70% *Graptophyllum pictum* dan *Spilanthes acmella* terhadap fraksi non-polar (heksana), semi polar (etil asetat) dan polar (butanol dan air). Masing-masing fraksi dilakukan uji aktivitas terhadap enzim alkaline fosfatase, dan diperoleh hasil bahwa fraksi polar yaitu butanol dan air mampu meningkatkan aktivitas enzim alkaline fosfatase dengan harga 112% dan 122% untuk *Graptophyllum pictum*, serta 126% dan 127% untuk *Spilanthes acmella* (Retno, 2010). Telah dilaporkan juga bahwa ekstrak etanol 70% dari *Barleria lupulina* dan kombinasi latihan fisik dari tanaman tersebut mampu meningkatkan kepadatan tulang dengan menggunakan metode pembebanan aksial tulang secara in vivo (Retno, et al., 2012).

Ekstrak etanol 70% *Spilanthes acmella* dikombinasikan dengan latihan fisik meningkatkan jumlah sel osteoblas secara bermakna bila dibandingkan dengan hanya ekstrak etanol atau latihan fisik. Ini membuktikan bahwa ekstrak etanol 70% *Spilanthes acmella* mempunyai efek additive terhadap efek latihan pembebanan aksial pada kondisi osteoporosis. Fraksi heksana, etil asetat dan air juga meningkatkan secara bermakna jumlah sel osteoblas. Fraksi non-polar merupakan fraksi yang lebih potensial untuk pembentukan tulang karena fraksi tersebut banyak mengandung senyawa turunan amida dan sesquiterpena (Laswati et al., 2015).

Ekstrak etanol 70% dari *Spilanthes acmella* berpotensi digunakan untuk pengobatan osteoporosis karena mampu meningkatkan pembentukan masa tulang dengan menstimulasi aktivitas dari enzim alkaline fosfatase, namun sejauh ini belum ada laporan tentang uji aktivitas anti-osteoporosis melalui peningkatan pembentukan tulang (osteoblas) dan penghambatan resorpsi tulang (osteoklas) dari ekstrak etanol 70%, fraksi heksan, etil asetat, butanol dan air serta senyawa yang terkandung di dalamnya. Dengan diketahuinya efek-efek tersebut dari tanaman ini,

diharapkan dapat mengungkap potensi *Spilanthes acmella* sebagai obat untuk penyakit osteoporosis baik melalui peningkatan pembentukan masa tulang (formasi tulang) maupun melalui penghambatan masa tulang (anti-resorpsi) sehingga *remodeling* tulang dalam tubuh dapat berjalan semestinya. Selain itu kajian tentang senyawa aktif dalam *Spilanthes acmella* sebagai anti-osteoporosis juga belum banyak dilaporkan, sehingga penelitian ini penting untuk dikembangkan.

BAB III

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1. Tujuan penelitian

- (1) Mengetahui aktivitas anti-osteoporosis dari ekstrak maupun fraksi heksan, etil asetat, butanol dan air dari tanaman *Spilanthus acmella* terhadap penghambatan dan peningkatan ketidakseimbangan remodeling tulang
- (2) Mengetahui fraksi aktif dalam tanaman *Spilanthus acmella* sebagai anti-osteoporosis
- (3) Mengetahui senyawa kandungan di dalam tanaman tersebut, senyawa aktif dan baru yang berpotensi sebagai anti-osteoporosis

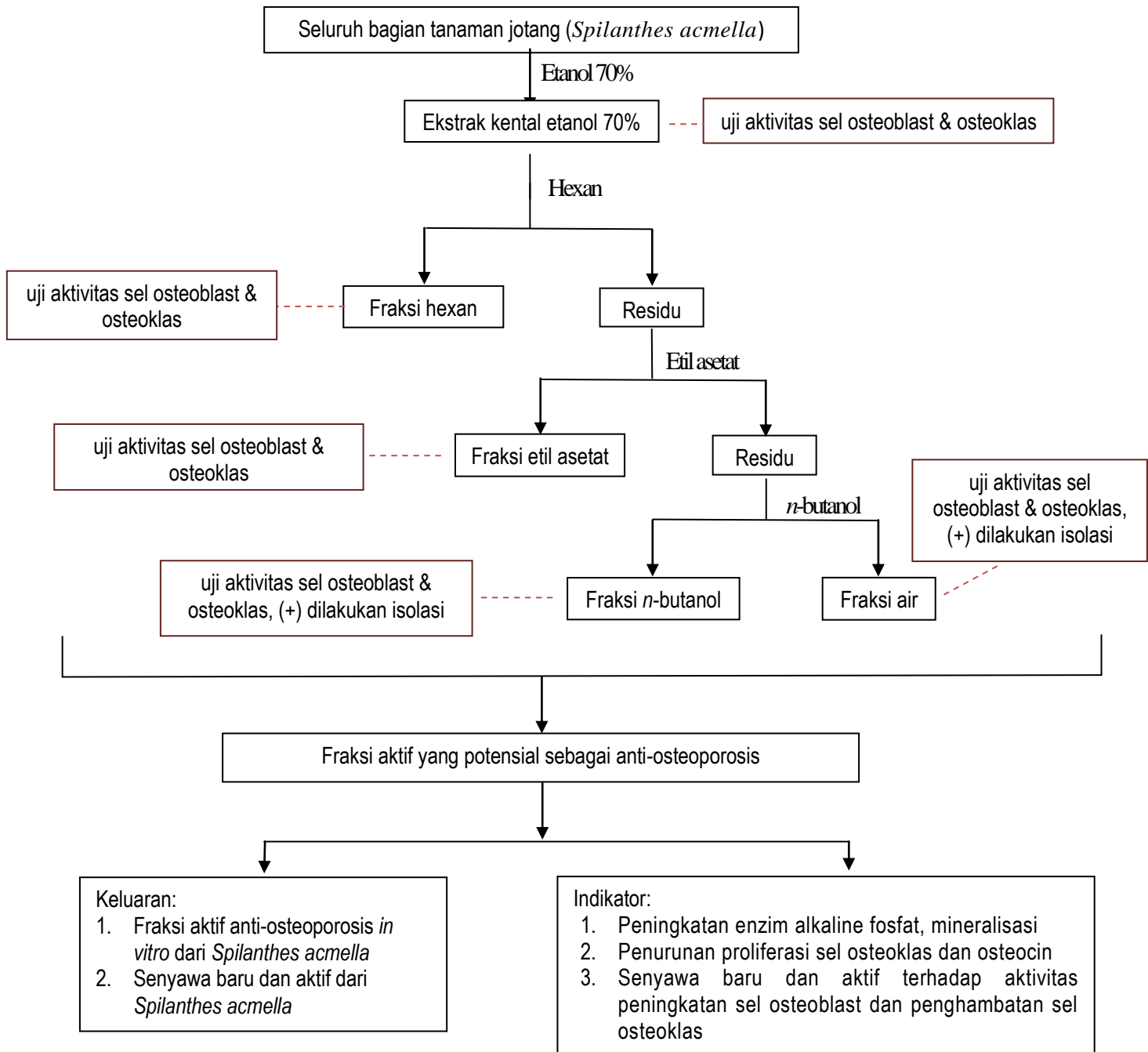
3.2. Manfaat penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah:

- (1) Diperolehnya suatu tumbuhan obat Indonesia yang mempunyai potensi untuk dikembangkan menjadi obat tradisional dalam pencegahan dan pengobatan penyakit osteoporosis yang potensial dan aman.
- (2) Memberikan data ilmiah bahwa pengaruh ekstrak etanol 70%, fraksi heksana, fraksi etil asetat, fraksi butanol dan fraksi air dari tanaman jatang (*Spilanthus acmella*) serta senyawa yang terkandung didalamnya dalam menghambat peningkatan ketidakseimbangan remodeling tulang sehingga bisa digunakan sebagai data ilmiah untuk penelitian selanjutnya.

BAB IV METODE PENELITIAN

4.1. Alur penelitian



Gambar 4.1. Bagan alur penelitian

4.2. Tempat dan waktu penelitian

Penelitian dilakukan pada dua laboratorium, yaitu Laboratorium Fitokimia, Fakultas Farmasi Unair, dan Laboratorium Farmakognosi Fakultas Farmasi Universitas Hiroshima. Untuk isolasi dan analisis bahan aktif dilakukan di Laboratorium Fitokimia Fakultas Farmasi UNAIR, sedangkan pengukuran NMR untuk identifikasi senyawa akan dikirimkan sampel ke Universitas Hiroshima. Penelitian uji aktivitas sel osteoblas dan osteoklas akan dilakukan di Laboratorium Dasar Bersama Fakultas Farmasi UNAIR. Penelitian tahun pertama akan dilakukan selama 8 bulan dari April 2017 sampai awal Desember 2017.

4.3. Bahan penelitian

Semua tanaman yang digunakan diperoleh dari Kebun Raya, Purwodadi. Bahan kimia yang digunakan pada penelitian ini berderajat pro analisa. Bahan kimia dapat dilihat pada rincian anggaran bahan kimia. Pengujian aktivitas pada sel osteoblast (MC3T3-E1) dan osteoklas yang diperoleh dari Universitas Hiroshima.

4.4. Alat penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah erlemeyer, beker glass, gelas pengaduk, pinset, vial, corong pisah, corong gelas, *rotary evaporator*, NMR untuk analisa senyawa, dan laminar air flow untuk melakukan uji aktivitas.

4.5. Prosedur penelitian

4.5.1. Pembuatan ekstrak *Spilanthes acmella*

Spilanthes acmella diperoleh dari Kebun Raya Purwodadi, Jawa Timur, Indonesia. Seluruh bagian tanaman kering dihaluskan sampai terbentuk serbuk dan diekstraksi dengan menggunakan etanol 70%. Penguapan etanol dilakukan dengan menggunakan *rotary evaporator* dan *freeze dry*. Ekstrak yang sudah kering, ditimbang beratnya dan disimpan dalam eksikator. Ekstrak tersebut telah dilakukan uji aktivitas anti-osteoporosis *in vitro* dan *in vivo* serta kombinasi latihan fisik.

4.5.2. Pembuatan fraksi non-polar, semi polar dan polar

Ekstrak etanol 70% yang telah diperoleh dilarutkan dengan air sampai larut sempurna dan dilakukan fraksinasi dengan menggunakan pelarut heksan, etil asetat dan

n-butanol. Masing-masing fraksi dilakukan uji aktivitas anti-osteoporosis *in vivo* dengan mengukur ketebalan tulang trabekula dari tulang femur mencit.

4.5.3. Uji aktivitas peningkatan ALP dari sel osteoblas

Sel yang 90% bergerombol dikultur dengan menggunakan medium α -MEM yang mengandung 10 mM β -glycerofosfate and 50 μ g/ml asam askorbat. Medium diganti setiap 2–3 hari, setelah 6 hari sel dikultur dengan medium yang mengandung 0.3% serum bovin and sampel selama 3 hari. Kemudian medium dibuang dan sel dicuci dengan menggunakan buffer fosfat salin sebanyak 3 kali. Sel dilisis dengan 0.2% triton X-100 dan disentrifuse pada 14000 x g selama 5 menit. Supernatan yang jernih digunakan untuk mengukur ALP dengan bantuan ALP assay kit (Retno *et. al.*, 2010).

4.5.4. Uji aktivitas penghambatan sel osteoklas

Sel osteoklas (1.5×10^4 sel/well) dikultur dengan α -MEM yang mengandung 50 ng/ml M-CSF dan 50 ng/ml RANKL. Mediaum diganti setiap 4 hari. Sampel ditambahkan pada hari ke-5. Kemudian sel dilisis dengan menggunakan bufer yang mengandung pNPP, reaksi dihentikan dengan penambahan larutan 0.3 N NaOH dan diukur absorbansiny dengan menggunakan mikroplate reader pada λ 405 nm.

Sel osteoklas (1×10^6 sel/well) juga dikultur dengan menggunakan medium yang mengandung 50 ng/ml M-CSF and 50 ng/ml RANKL pada 6-well plates selama 7 hari pada 37 °C dalam 5 % CO₂, kemudian ditambahkan sampel uji. Total RNA dari sel diisolasi dengan menggunakan NucleoSpin. DNA sampel dianalisa dengan menggunakan PCR (Oshita *et al.*, 2011).

4.5.5. Analisa statistik

Data yang diperoleh dilakukan analisis deskriptif dan inferensial. Perbedaan rerata ketebalan trabekula dari setiap kelompok dianalisis menggunakan uji anova satu arah. Jika terdapat perbedaan dilanjutkan dengan uji post hoc dengan uji beda nyata terkecil/LSD untuk menguji perbedaan dan rata rata perlakuan. Jika data tidak berdistribusi normal digunakan uji Kruskal-Wallis. Nilai *p* dihitung kurang dari 0,05 sebagai signifikansi figure.

BAB V

HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI

5.1. Hasil ekstraksi dan fraksinasi *Spilanthes acmella*

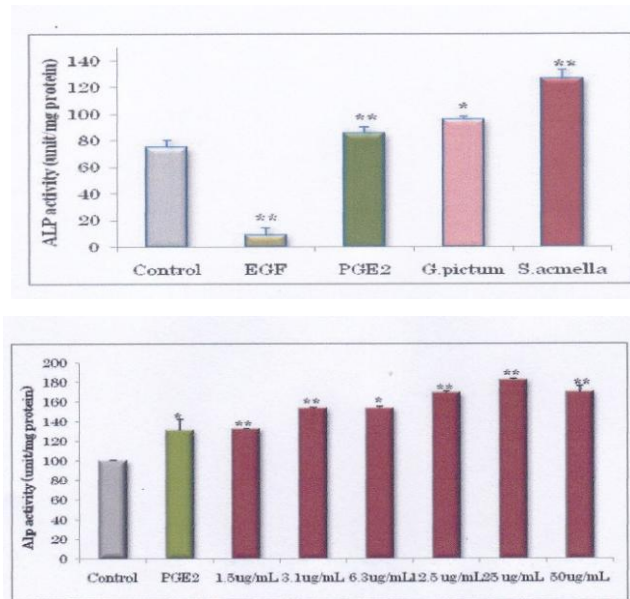
Dari 2 kg simplisia kering *Spilanthes acmella* dilakukan proses maserasi dengan menggunakan etanol 70% sebanyak 10 l selama 3 kali, dan diperoleh hasil ekstrak etanol 70% sebanyak 200 g. Dilakukan fraksinasi pada ekstrak etanol 70% berdasarkan tingkat polaritasnya yaitu dengan mencampurkan ekstrak etanol 70% dengan sedikit aquadest (100 ml) dan dilakukan pengocokan dengan heksana (1l) dengan menggunakan corong pisah, lalu diamkan sampai terjadi pemisahan (3 kali perlakuan). Filtratnya diuapkan dengan menggunakan rotavapor dan diperoleh fraksi heksana. Residu dikocok kembali dengan etil asetat (3 kali perlakuan). Filtrat hasil pengocokan dengan etil asetat diuapkan dengan rotavapor dan diperoleh fraksi etil asetat, residunya dikocok lagi dengan butanol (3 kali perlakuan). Filtrat hasil pengocokan diuapkan dengan rotavapor dan diperoleh fraksi butanol sedangkan residunya dikeringkan dengan menggunakan *freeze dry* dan diperoleh fraksi air. Hasil ekstraksi dan fraksinasi terlihat pada tabel 5.1.

Tabel 5.1. Hasil fraksinasi dari ekstrak etanol 70% *Spilanthes acmella*

Fraksi	Banyak pelarut	Berat Fraksi
Heksana	1000 ml	23,5 g
Etil asetat	1000 ml	40,4 g
Butanol	1000 ml	47,5 g
Air	100 ml	47 g

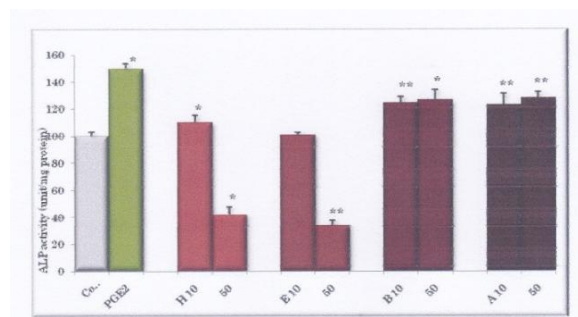
5.2. Uji aktivitas ALP dari ekstrak dan fraksi - fraksi *Spilanthes acmella*

Ekstrak etanol 70% dari *Spilanthes acmella* mampu meningkatkan aktivitas enzim ALP sebesar 169% terhadap sel osteoblast MC3T3-E1 pada konsentrasi 50 µg/mL (gambar 5.1a). Kemudian dilakukan pengujian pada beberapa dosis ekstrak dan diperoleh hasil bahwa ekstrak tersebut mempunyai aktivitas peningkatan terhadap enzim ALP berdasarkan peningkatan dosis sampai dengan konsentrasi 25 µg/mL (gambar 5.1b).



Gambar 5.1. Peningkatan aktivitas enzim ALP dari ekstrak etanol 70% *Spilanthes acmella*

Ekstrak etanol 70% pada aktivitas ALP dari sel osteoblas MC3T3-E1 menunjukkan bahwa ekstrak tersebut memiliki efek bifasik, dimana pada konsentrasi rendah, mampu merangsang aktivitas ALP. Feng pernah melaporkan pada sampel yang berbeda yaitu enterolakton dan enterodiol memiliki efek bifasik terhadap kelangsungan hidup dan aktivitas ALP dari sel MG-63 dan sintesis DNA pada sel MCF-7 (sel kanker payudara). Pada konsentrasi yang relatif rendah, beberapa fitoestrogen mengekspresikan aktivitas estrogenik dan merangsang pertumbuhan sel, sementara pada konsentrasi yang lebih tinggi fitoestrogen yang sama tampaknya antiestrogenik dan menekan pertumbuhan sel. Cara kerja bifasik dapat mewakili terapi anabolik yang tepat untuk osteoporosis.



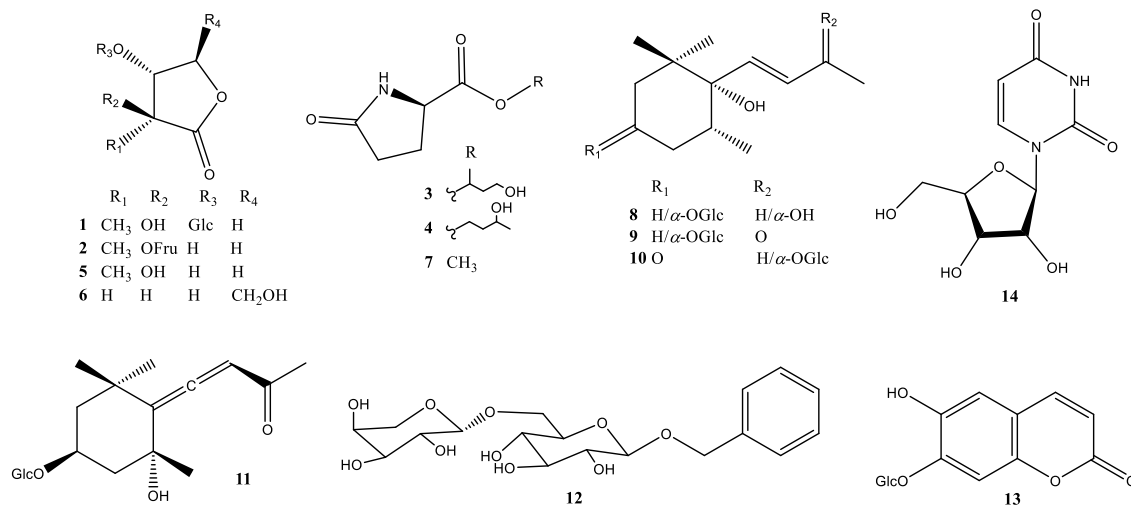
Gambar 5.2. Peningkatan aktivitas enzim ALP dari fraksi-fraksi *Spilanthes acmella*

Diantara fraksi heksana, etil asetat, n-butanol dan fraksi air dari *Spilanthes acmella*, fraksi n-butanol dan air mampu meningkatkan aktivitas ALP sebesar 126% dan 127%, namun heksana dan etil asetat tidak menunjukkan aktivitasnya (Gambar 5.2).

5.3. Hasil isolasi senyawa dalam fraksi butanol *Spilanthes acmella*

Pada fraksi butanol (40,0 g) dilakukan pemisahan menggunakan kolom kromatografi dengan fase diam 300 g silika gel dan fase gerak metanol-kloroform secara gradien [hexana-kloroform (1:1), 4l, kloroform-metanol (50:1, 40:1, 30:1, 20:1, 15:1, 10:1, 7:1, 5:1, 3:1, 2:1, 2l), masing-masing 500 ml], dan diperoleh 19 fraksi (Sab1 – Sab12). Pada fraksi Sab11 (2,75 g) dipisahkan kembali menggunakan kolom kromatografi dengan fase diam ODS dan fase gerak metanol 10% – 100% secara gradien (400 ml) diperoleh 10 fraksi (Sab11-1 – Sab11-10). Fraksi Sab11-3 (442 mg) dan Sab11-4 (123 mg) dimurnikan menggunakan HPLC dengan pelarut metanol 35% dan diperoleh hasil senyawa **1** (10,1 mg) and **8** (dendrantemosida A, 3,71 mg). Fraksi Sab10 (1,81 g) dipisahkan juga menggunakan kolom kromatografi dengan fase diam ODS dan fase gerak metanol 10% – 100% secara gradien (400 ml) diperoleh 7 fraksi (Sab10-1 – Sab10-7). Pada fraksi Sab10-1 (770 mg) dimurnikan menggunakan HPLC kolom YMC dengan pelarut air. Diperoleh 3 puncak pada 5, 18 dan 35 menit yaitu senyawa **2** (7,62 mg), **5** (2-C-metil-D-treono-1,4-lakton, 9,31 mg), dan **14** (uridina, 27,5 mg). Sab10-2 (193 mg) dimurnikan menggunakan HPLC dengan pelarut metanol 20% diperoleh senyawa **11** (ikarisida B2, 6,12 mg) and **13** (cikoriin, 2,99 mg). Fraksi Sab10-3 (142 mg) juga dipisahkan menggunakan HPLC dengan pelarut metanol 35% dan diperoleh hasil **9** (dendrantemosida B, 4,31 mg). Fraksi Sab5 (710 mg) dipisahkan kembali menggunakan kolom kromatografi dengan fase diam ODS dan fase gerak methanol 10% – 100% secara gradien (400 ml) dan diperoleh 10 fraksi (Sab5-1 – Sab5-10). Fraksi Sab5-1 (483 mg) and Sab5-2 (68,3 mg) dimurnikan menggunakan HPLC dengan pelarut air dan diperoleh senyawa **3** (7,80 mg), **4** (4,21 mg) dan **7** (metil piroglutamat, 6,63 mg). Campuran dari fraksi Sab6, Sab7, Sab8 dan Sab9 (2,06 g) dipisahkan kembali menggunakan kolom ODS dan fase gerak metanol 10% – 100% secara gradien (400 ml) diperoleh 10 fraksi (Sab6-9-1 – Sab6-9-10). Fraksi Sab6-9-1 (340 mg) dimurnikan menggunakan HPLC dengan pelarut air didapatkan senyawa **6** (2-deoksi-D-ribono-1,4 lakton, 6,01 mg). Fraksi Sab6-9-4 (114 mg) dimurnikan

menggunakan HPLC dan pelarut metanol 40% diperoleh hasil **10** (ampelosisinosa, 5,43 mg). Fraksi Sab12 (5,36 g) dipisahkan kembali menggunakan kolom kromatografi ODS dan fase gerak metanol 10% – 100% secara gradien (400 ml) diperoleh sebanyak 10 fraksi (Sab12-1 – Sab12-10). Fraksi Sab12-3 (129 mg) dimurnikan menggunakan HPLC dengan pelarut metanol 35% dan diperoleh senyawa **12** (benzil- α -L-arabinopiranosil (1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosida, 4,51 mg).



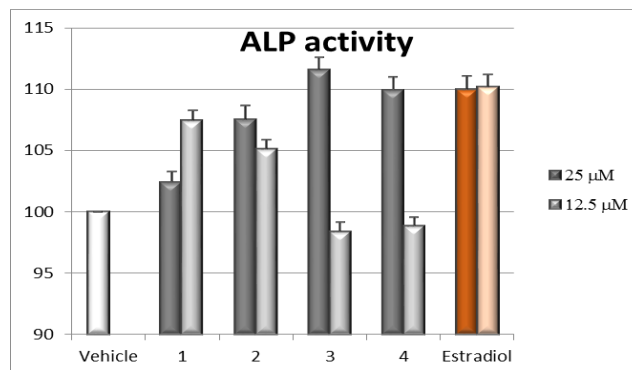
Gambar 5.1. Struktur dari senyawa dalam fraksi butanol *Spilanthes acmella*

5.4. Uji aktivitas ALP dari senyawa dalam fraksi butanol *Spilanthes acmella*

Osteoblas merupakan sel terpenting dalam jaringan tulang dan berhubungan dengan proses proliferasi dan diferensiasi pada pembentukan masa tulang dalam tubuh manusia. Selama proses diferensiasi, protein morfogenetik pada tulang (BMP) menginduksi ekspresi pembentukan sel osteoblast yang merupakan marker dari pembentukan masa tulang. Hal ini didukung oleh peningkatan jumlah enzim alkaline fosfatase (ALP). Pada proses proliferasi, ALP juga meningkatkan jumlah masa tulang. Jadi ALP merupakan enzim yang terikat membran dan sering digunakan sebagai penanda diferensiasi osteogenik.

Untuk mengetahui pengaruh senyawa **1** – **4** yang telah diisolasi dari fraksi butanol *Spilanthes acmella* terhadap fungsi sel osteoblas, dilakukan pengujian senyawa-senyawa tersebut terhadap peningkatan aktivitas enzim ALP yang berhubungan dengan pembentukan osteosid dan inisiasi pengendapan mineral. Dalam penelitian ini, ditemukan bahwa **1**, **2**, **3** dan **4** meningkatkan aktivitas enzim ALP yang juga menunjukkan bahwa senyawa tersebut meningkatkan pertumbuhan dan diferensiasi sel

osteoblast (MC3T3-E1). Senyawa **3** dan **4** dengan konsentrasi 25 μM mampu meningkatkan aktivitas enzim ALP sampai dengan 112%, lebih kuat bila dibandingkan dengan kontrol positif, 17β -estradiol.



Gambar 5.4. Peningkatan aktivitas enzim ALP dari senyawa **1–4** terhadap sel osteoblast MC3T3-E1

5.5. Luaran yang dicapai

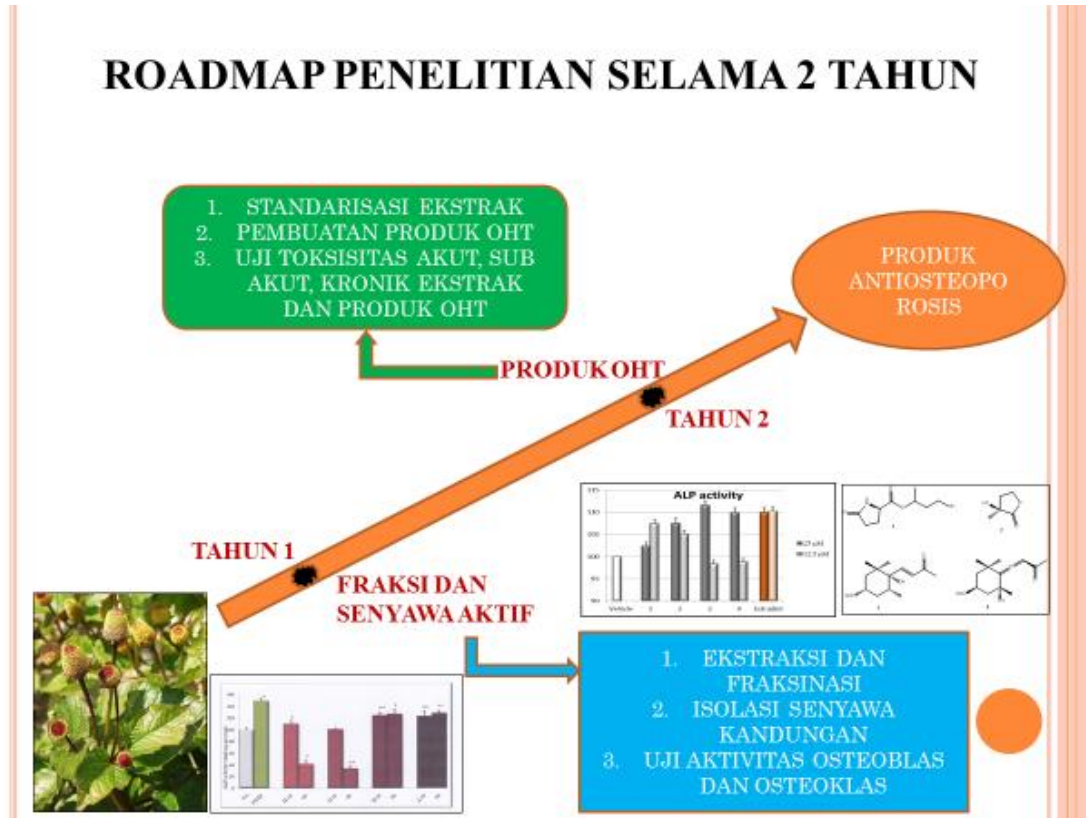
Luaran yang telah tercapai pada tahun pertama penelitian ini adalah:

- (1) Fraksi aktif (butanol) sebagai anti-osteoporosis dengan meningkatkan aktivitas enzim ALP pada sel osteoblas
- (2) Submit hasil penelitian di seminar internasional **ICONPROBIOS 2017** (International Conference on Natural Product and Bioresource Sciences) dengan topik Natural Product for Sustainable Life pada tanggal 23 – 24 oktober 2017 di Balai Kartini Convention Center, Jakarta terindeks scopus (lampiran 1)
- (3) Submit artikel yang akan dipublikasi pada jurnal internasional Chemical and Pharmaceutical Bulletin, impact factor 1.33 (lampiran 2)
- (4) Draft artikel yang akan disubmit pada jurnal Nasional terakreditasi Jurnal Bahan Alam Indonesia, akreditasi A (lampiran 3)
- (5) Draft paten (lampiran 4).

BAB VI

RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA

6.1. Roadmap penelitian



Gambar 6.1. Roadmap penelitian selama 2 tahun

Dari bagan roadmap tersebut, telah dilakukan proses ekstraksi, fraksinasi dan isolasi senyawa kandungan dalam tanaman jotang dan juga telah dilakukan uji aktivitas dari masing-masing bahan uji seperti ekstrak, fraksi dan senyawa kandungan sehingga diperoleh fraksi aktif yaitu fraksi butanol dan 14 senyawa yang terkandung didalamnya. Pada tahun kedua akan dilakukan proses standarisasi simplisia dan ekstrak untuk peningkatan mutu bahan baku, kemudian dibuat produk OHT dari ekstrak atau fraksi terpilih dan terakhir dilakukan uji toksisitas akut, sub akut dan kronik pada ekstrak dan produk OHT.

6.2. Rencana yang akan dilakukan pada tahun ke-2

Tabel 6.1. Rencana kegiatan penelitian yang akan dilakukan pada tahun berikutnya

No.	Target Uji	Action plan
1.	Standarisasi ekstrak etanol 70% jotang	Dilakukan pengujian beberapa parameter seperti: <ul style="list-style-type: none">- Parameter non spesifik- Parameter spesifik- Uji kandungan kimia ekstrak Semuanya dilakukan sesuai dengan buku Materia Medika atau Farmakope Herbal Indonesia
2.	Formulasi produk OHT	Dilakukan penentuan formula produk OHT, yang kemudian akan dilakukan uji terhadap: <ul style="list-style-type: none">- Uji stabilitas produk- Uji sifat alir produk- Uji disolusi produk
3.	Uji toksisitas akut, sub akut dan kronik pada ekstrak dan produk	Sebelum pengujian ditahap ini dilakukan maka harus dilakukan pengujian kode etik, kemudian dilakukan uji toksisitas: <ul style="list-style-type: none">- Toksisitas akut- Toksisitas sub akut- Toksisitas kronik

BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan pada tahun pertama penelitian ini adalah:

- (1) Fraksi aktif sebagai anti-osteoporosis dengan meningkatkan aktivitas enzim ALP pada sel osteoblas pada tanaman jotang (*Spilanthes acmella*) adalah fraksi butanol dan air
- (2) Diperoleh 14 senyawa dari fraksi butanol dan mempunyai aktivita meningkatkan aktivitas enzim ALP, khususnya dendratemosida B dan ikarisida B2 sampai dengan 112%

DAFTAR PUSTAKA

- Fleisch H., 1998. Bisphosphonate: Mechanism of action. *Endocrine Reviews* 19, 80–100.
- Franceschi R.T., Young J., 1990. Regulation of Alkaline Phosphatase by 1,25-dihydroxyvitamin D3 and Ascorbic acid in Bone-derived Cells. *Journal of Bone and Mineral Research* 5, 1157–1167.
- Harborne, J.B., 1987. *Metode Fitokimia, Penentuan Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Terbitan Kedua, ITB, Bandung.
- Irwan M., 2008. *Osteoporosis*, Fakultas Kedokteran Universitas Riau, RSUD Arifin Achmad Pekanbaru.
- Jennifer J.W., 2008. *Methods in Molecular Biology: Osteoporosis Methods and Protocol*, Human Press.
- Kostenuik P.J., Harris J., Halloran B.P., Turner R.T., Morey-Holton E.R., and Bikle D.D., 1999. Skeletal unloading causes resistance of osteoprogenitor cells to parathyroid hormone and to insuline-like growth factor-I. *J. Bone Miner. Res.*, 14, 21–31.
- Laswati, H.P., 2007, Kombinasi Latihan Fisik dan Pemberian Daun Semanggi Menghambat Peningkatan Ketidakseimbangan Proses Remodeling Tulang Perempuan Pascamenopause melalui Peran Reseptor Estrogen a Sel Osteoblas. *Disertasi*, Program Pascasarjana Universitas Airlangga.
- Laswati H.P, Imam S., Retno W., Mangestuti A., Jahya A.P., 2015. *Spilanthus acmella* and Physical Exercise Increased Testosterone Levels and Osteoblast Cells in Glucocorticoid Induced Osteoporosis Male Mice. *Bali Medical Journal* 4 (2), 76–81.
- Mashiba T., Mori S., Burr D.B., Komatsubara S., Cao Y., Manabe T., 2005. The effects of suppress bone remodeling by bisphosphonates on microdamage accumulation and degree of mineralization in the cortical bone of dog rib. *Journal of Bone Mineral and Metabolism* 23, 36–42.
- NIH., 2001. Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis and Therapy: Osteoporosis prevention, diagnosis and therapy. *Journal of American Medical Association* 285, 785–795.
- Oshita K., Yamaoka K., Udagawa N., Fukuyo S., Sonomoto K., Maeshima K., 2011. Human mesenchymal stem cells inhibit osteoclastogenesis through osteoprotegerin production. *Arthritis Rheum.*, 63,1658–1667.
- Pramono, S., 2007. *Jamu in Indonesian daily life and industry*. Institute of natural medicine, University of Toyama, p 1.
- Retno W., Yasuhiro T., Tatsurou M., Suresh A., Shigetoshi K., 2010. Alkaline Phosphatase (ALP) Enhancing Iridoid Glucosides from The Indonesian Medicinal Plant *Barleria lupulina*. *Natural Product Communication* 5 (11), 1711–1716.
- Retno W., 2010. Alkaline Phosphatase Activity of *Graptophyllum pictum* and *Sphilanthus acmella* Fractions againts MC3T3-E1 Cells as Marker of Osteoblast Differentiation Cells. *Intern. J. Pharm. & Pharm. Sci.* 3 (1), 34–37.
- Retno W., Mangestuti A., Laswati H., 2012. Efek Pemberian Ekstrak Etanol 70% *Barleria lupulina* dan Kombinasi Latihan Fisik pada Mencit yang Diinduksi Deksametason. *Jurnal Bahan Alam Indonesia* 8 (1), 58–61
- Sudoyo, S.A. dan Simadibrata, S., 2006, Osteoporosis. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam*,

- Jilid II, Edisi IV, Jakarta, FKUI.
- Supaluk P., Saowapa S., Apilak W., Ratana L., Somsak R., and Virapong P., 2009. Bioactive metabolites from *Spilanthes acmella* Murr, *Molecules*, 4 (12), 850–867.
- Stevenson, J., and Marsh, M., 2007. *An Atlas of Osteoporosis*. Informa Healthcare, 3rd edition, p 2, 12–13.
- Tomohito, H., Nobuo, S., Retno, W., Ttsuro, M., Shigetoshi, K., Horoshi, O., Kei, H., 2009. The Depressive Effects of 5,8,11-Eicosatrienoic Acid (20:3n-9) on Osteoblasts. *Lipid* 44, 97–102.
- Whyte M.P., Wenkert D., Clements K.L., McAlister W.H., Mumm S., 2003. Bisphosphonate-induced osteopetrosis. *The New England Journal of Medicine* 349, 457–463.
- Woo S.B., Hellstein J.W., Kalmar J.R., 2006. Systematic review: Bisphosphonates and osteonecrosis of the jaws. *Annals of Internal Medicine*. 144, 753–761.

LAMPIRAN I. BUKTI LUARAN YANG TELAH DICAPAI

1. Abstrak ICONPROBIOS 2017

Osteoblast stimulatory of *Spilanthes acmella* and their new lactones

Retno Widyowati^{*}, Wiwied ekasari, Neny Purwitasari
Faculty of Pharmacy, Airlangga University

[Objective] *Spilanthes acmella* is a medicinal plant that distributed in the tropical and subtropical regions with rich source of therapeutic and medicinal constituents. The main constituents, “spilanthol” and “acmellonate”, are used to reduce the pain associated with toothaches and induce saliva secretion. It is also used traditionally as treatment of rheumatism, tongue paralysis, antipyretic, sore throat, and gum infections [1]. The hexane, ethyl acetate, *n*-butanol and water fractions from this plant was evaluated the stimulative activity on alkaline phosphatase (ALP) of MC3T3-E1 osteoblast cells and the *n*-butanol and water fractions showed the activity to 126% and 127%, respectively [2]. In the previous study, this plant contains a new methyl threonolactone glucoside, a new methyl threonolactone fructofuranoside and two new pyroglutamates along with 2-*C*-methyl-*D*-threono-1,4-lactone, 2-deoxy-*D*-ribono-1,4-lactone, methyl pyroglutamate, dendranthemoside A, dendranthemoside B, ampelopsisionoside, icariside B2, benzyl- α -*L*-arabinopyranosyl-(1-6)- β -*D*-glucopyranoside and chicoriin [3].

[Methods] The aerial parts of *Spilanthes acmella* were collected in Purwodadi, Indonesia, then extracted with methanol. The obtained methanol extract was concentrated and partitioned with *n*-hexane, ethyl acetate, and *n*-butanol, successively. Several compounds were isolated from *n*-butanol and evaluated the ALP and mineralization stimulatory activities of MC3T3-E1 cell as osteoblast markers.

[Results] On investigation of the *n*-butanol layer of this plant, new methyl threonolactone glucoside, 2-deoxy-*D*-ribono-1,4 lactone, ampelosisinoside, and benzyl- α -*L*-arabinopyranosyl (1 \rightarrow 6)- β -*D*-glucopyranoside stimulated alkaline phosphatase and mineralization activity up to 112%, which were comparable to the positive control, 17 β -estradiol (110% and 106%, respectively) without any significant cytotoxicity. This study provides further usefulness of this plant material as the osteoblast stimulating activity toward osteoporosis.

References

- [1] Dubey, S. *et al.* (2013) Advances in Pharmacological Sciences, ID 423750, doi: 10.1155/2013/423750
- [2] Retno (2011) International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences ISSN- 0975-1491 Vol 3, Suppl 1
- [3] Retno *et al.* (2015) Proceeding Inaugural Symposium of the phytochemical society of Asia (ISPSA) Tokushima

[rr retno widyowati <rr-retno-w@ff.unair.ac.id>](mailto:rr-retno-w@ff.unair.ac.id)

To

[retno widyowati](#)

Sep 6 at 1:23 PM

Dikirim dari iPhone saya

Awal pesan yang diteruskan:

Dari: iconprobios2017@mail.lipi.go.id

Tanggal: 1 Agustus 2017 09.18.44 WIB

Kepada: rr-retno-w@ff.unair.ac.id

Subjek: ICONPROBIOS 2017 : Fullpaper reminder-Please ignore this email if you already submitted the fullpaper

Dear authors:

Thank you for submitting your abstract into our conference Iconprobios 2017. Now, we are looking forward to accept your full paper as soon as possible using our EDAS website (<https://edas.info/N23423>).

Dont hesitate to contact us when you have a problem with EDAS to submit your full paper. Thank you very much for your kind attention and cooperation.

Sincerely,

The conference chairs

Your registration page :

<http://www.opi.lipi.go.id/pertemuan.cgi?registrasi&&&1484554808&Inggris&1228964432>

[username : 1501487746, password : tuba050177]

ICONPROBIOS 2017 - <http://situs.opi.lipi.go.id/iconprobios2017/>

- <http://www.opi.lipi.go.id>

ICONPROBIOS

International Conference on Natural Product and Bioresource Sciences



Certificate

The International Conference on Natural Products and Bioresource Science 2017
(ICONPROBIOS 2017)
Is hereby awarding this certificate to

Rt. Retno Widyawati, S.Si., M.Pharm., Ph.D., Apt.

In recognition of his/her contribution as **Participant** in this conference.

Yogyakarta, October 25, 2017

The Conference Chair

Dr. Anastasia Wheni Indrianingsih, M.Sc.Eng



Indonesian Institute Of Sciences
Research Unit for Natural Product Technology
Jl. Joga Wanasari Km 31.5 Yogyakarta, Indonesia 55861

LAMPIRAN II. BUKTI LUARAN YANG TELAH DICAPAI

2. Submit artikel internasional yang akan dipublikasi di Chemical and Pharmaceutical Bulletin (impact factor 1.33)

NEW METHYL THREONOLACTONES AND PYROGLUTAMATES OF *SPHILANTHES ACMELLA* AND THEIR BONE FORMATION ACTIVITIES

Retno Widyowati¹⁾, Mangestuti Agil¹⁾, Katsuyoshi Matsunami²⁾

1) Faculty of Pharmacy, Airlangga University, Surabaya, Indonesia

2) Graduate School of Biomedical & Health Sciences, Hiroshima University, Japan

ABSTRACT

A new methyl threonolactone glycoside (**1**), a new methyl threonolactone fructofuranoside (**2**), two new pyroglutamates (**3–4**) and ten known compounds (**5–14**) were isolated from whole plant of *Spilanthes acmella*. The structures of these compounds were determined by various spectroscopic analysis and based on chemical evidences. All the isolated compounds were evaluated toward bone formation parameter, such as alkaline phosphatase (ALP) and mineralization stimulatory activities of MC3T3-E1 cell lines. Therefore new compounds **1**, **2**, 2-deoxy-D-ribo-1,4 lactone (**6**), methyl pyroglutamate (**7**), dendranthemoside A (**8**) and benzyl- α -L-arabinopyranosyl (1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside (**12**) stimulated alkaline phosphatase activity, then dendranthemoside A (**8**) and benzyl- α -L-arabinopyranosyl (1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside (**12**) stimulated mineralization activity.

Keywords: *Spilanthes acmella*; alkaline phosphatase; mineralization; methyl threonolactone; pyroglutamate

Introduction

Spilanthes acmella Murr. (Compositae) is a genus comprising of over 60 species that are widely distributed in tropical and subtropical regions of the world, such as Africa, America, Borneo, India, Sri Lanka and Asia.^{1,2)} The plant species has been used commonly as a folk remedy, e.g. for toothache and skin disease,³⁾ rheumatism and fever,⁴⁾ dysentery, a snake bite remedy, stammering in children,²⁾ antiseptic, antibacterial, antifungal, antimalarial, influenza, cough, rabies diseases, and tuberculosis.^{5,6)} It is also known to be used as panacea (Sumatra,

Indonesia), stimulant of toothache (Sudan), stomatitis (Java, Indonesia), and wound healing (India).⁷⁾

The main constituents from the whole aerial parts, flower heads and roots of this plant yield “spilanthol” and “acmellonate,” they are sometimes used to reduce the pain associated with toothaches, induce saliva secretion^{3,5,8)} and is a powerful insecticide and local anaesthetic.^{2,9,10)} In addition, it also has an important source of highly valuable bioactive compounds such as phenolics, coumarin (scopoletin), triterpenoids¹¹⁾ and flavonoids.¹²⁾ In the previous study, 1-butanol and water layers of 70% ethanol extract of *Spilanthes acmella* stimulated alkaline phosphatase activity of MC3T3-E1 osteoblast cells (126% and 127%, respectively).¹³⁾ Further investigation of the 1-butanol layers of the same plant has demonstrated the present of a new methyl threonolactone glycoside (**1**), a new methyl threonolactone fructofuranoside (**2**), two new pyroglutamates (**3–4**), 2-*C*-methyl-*D*-threono-1,4 lactone (**5**), 2-deoxy-*D*-ribo-1,4 lactone (**6**), methyl pyroglutamate (**7**), dendranthemside A (**8**), dendranthemside B (**9**), ampelopsisionoside (**10**), icariside B2 (**11**), benzyl- α -*L*-arabinopyranosyl (1 \rightarrow 6)- β -*D*-glucopyranoside (**12**), chicoriin (**13**) and uridine (**14**) (Fig. 1). They were isolated by various chromatographic techniques such as silica gel, ODS, HPLC and determined as follows by spectrometric analysis (UV, IR, HR-ESI-MS, 1D and 2D NMR). We report here the isolation and structural elucidation of four new compounds. Two of them were found to be glycosylated with the different disaccharide, consisting *D*-glucose and *L*-fructose of **1** and **2**, respectively.

Results and discussion

The 1-butanol layers of a methanol extract of *Spilanthes acmella* was fractioned by several types of chromatography to afford fourteen compounds (**1–14**).

New compounds **1**, 2-*C*-methyl-*D*-threono-1,4-lactone- β -*D*-glucopyranoside, was obtained as colorless powder with molecular formula of C₁₁H₁₈O₉ as determined by HR-ESI-MS at *m/z* 317.0845 [M]⁺(calcd. for C₁₁H₁₈O₉Na : 317.0843). The presence of a saturated γ -lactone moiety was observed in the IR spectrum by the carbonyl group signal at 1777 cm⁻¹ and a broad carbonyl stretching band in the region 1100–1600 cm⁻¹ suggested as a glycosidic nature.

The ¹H NMR spectrum (Table 1) displayed signals due to a methyl proton at δ_H 1.41 (s), four oxygenated methylene protons at δ_H 3.60 (dd, *J* = 11.6, 7.4 Hz), 3.91 (dd, *J* = 11.6, 2.5 Hz), 4.10 (dd, *J* = 9.5, 6.5 Hz) and 4.52 (dd, *J* = 9.5, 6.5 Hz), five oxygenated methine protons at δ_H 3.24 (dd, *J* = 9.2, 7.7 Hz), 3.26 (dd, *J* = 9.8, 8.9 Hz), 3.34 (ddd, *J* = 9.8, 7.4, 2.5 Hz), 3.36 (t-like, *J* = 9.2 Hz) and 4.43 (t-like, *J* = 6.5 Hz) and an anomeric proton at δ_H 4.37 (d, *J* = 7.7 Hz). The lactone moiety was clearly evidenced by the chemical shifts and coupling constants of an

AMX system corresponding to H-5a (4.10, dd, $J = 9.5, 6.4$ Hz), H-5b (4.51, dd, $J = 9.5, 6.6$ Hz) and H-4 (4.43, t-like, $J = 6.5$ Hz).

The ^{13}C NMR spectrum (Table 1) of **1** showed 11 carbon resonances that classified by analysis of its chemical shift values and its HSQC spectrum as a methyl carbon (δ_{C} 19.2), two oxygenated methylene carbons (δ_{C} 63.2, 69.9), five oxygenated methine carbons (δ_{C} 72.2, 74.9, 78.1, 78.2, 83.4), a quaternary carbon (δ_{C} 75.7), an anomeric carbon (δ_{C} 104.0) and a carbonyl carbon at δ_{C} 179.4. The diastereomer of 2-*C*-methyl group distinguished by ^{13}C spectroscopy, the chemical shift of the 2-*C*-methyl group of the *cis*-diol *erythrono*-isomer δ_{C} 19.9 is at significantly lower field than the *trans*-diol *threono*-isomer δ_{C} 16.6.^{14,15)}

The NMR spectroscopic data of **1** closely resembled that of 2-*C*-methyl-D-threono-1,4 lactone (**5**),¹⁶⁾ except for some differences in the chemical shift values at C-4. The deshielded proton at δ_{H} 4.43 and carbon at δ_{C} 83.4 of **1** suggested that glucoside group was attached to C-4. This was confirmed in the HMBC experiment by the correlation between H-4 (δ_{H} 4.43) and carbon signal at δ_{C} 104.0 (Fig. 2). While five signals were corresponded to C1-C5 of β -D-glucopyranose, the anomeric carbon signal, resonating at δ_{C} 104.0, was indicative of the participation of this carbon in an ester linkage. The highly deshielded chemical shift of an anomeric proton signal (δ_{H} 4.37) was in accordance with this assumption and its coupling constant ($J = 7.7$ Hz) recommended the β mode of linkage. Its relative configuration of **1** was established by NOESY analysis. The correlations were observed between H-5b/Me-6 and H-4/H-5a which suggested the orientation of H-5b, and Me-6 to be α -oriented, and those of H-4 and H-5a to be β -oriented (Fig. 3). The absolute stereochemistry of the lactone moiety of **1** was determined by mild acid hydrolysis of **1** with 1N HCl showed initial removal of 2-*C*-methyl-D-threono-1,4 lactone (**1a**) and D-glucose unit.¹⁷⁾ The lactone compound (**1a**) showed the same absolute stereochemistry with 2-*C*-methyl-D-threono-1,4 lactone (**5**) by spectroscopic (UV, IR, HR-ESI-MS, 1D NMR) and HPLC analysis. Based on spectrum analysis, the structure of **1** was determined as 2-*C*-methyl-D-threono-1,4 lactone-D-glucopyranoside.

New compound **2**, was also a 2-*C*-methyl-D-threono-1,4 lactone. It was obtained as pale yellow solid, whose molecular formula was determined to be $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{O}_9$ from its positive-ion mode HR-ESI-MS data at m/z 317.0844 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd. 317.0843). The ^1H and ^{13}C NMR spectrum (Table 1 and 2) of **2** were very similar to those of 2-*C*-methyl-D-threono-1,4 lactone (**5**). The ^{13}C NMR were also showed two secondary carbons at δ_{C} 60.7 and 63.0, three tertiary carbons at δ_{C} 79.1, 82.7 and 84.8 and a quaternary carbon at δ_{C} 109.4, they indicated as fructofuranose moiety. The diastereomer of 2-*C* methyl group was distinguished by ^{13}C NMR data of Me-6, therefore its chemical shift is at δ_{C} 19, it indicated as *cis*-erythrono but its is δ_{C} 17 that indicated as *trans*-threono.¹⁵⁾

The position of fructofuranose moiety were deduced to be at C-3 by analysis of the HMBC data showing correlations of H-1' and H-2' to carbons at δ_C 76.0 (Fig. 4). Its relative configuration of **2** was established by NOESY analysis. The correlation of H-5/Me-6 suggested as α orientation. Another correlations were observed between H-5/H-4 which suggested as β -oriented (Fig. 5). Zheng et al. (2009) described that α and β orientation of D-fructofuranose were distinguished by J value of position 3 and chemical shift of C-2 of fructofuranose moiety. The $J = 3 - 4$ Hz and C-2 $> 2 - 4$ ppm, 107-109 is α orientation, while the $J = 7 - 9$ Hz and C-2 $< 2 - 4$ ppm, 103 - 106 is β orientation.¹⁸⁾ Based on that reference, **2** was α -D-fructofuranose. The acid hydrolysis of **2** yielded the aglycone (2-C-methyl-D-threono-1,4-lactone-) and D-fructofuranose (Fig. 6), thus the structure of **2** was determined as 2-C-methyl-D-threono-1,4-lactone- α -D-fructofuranoside.

The 2-butanol pyroglutamate (**3**) was also colorless solid and displayed an $[M+Na]^+$ ion peak at m/z 224.0890 (calcd. 224.0893) corresponding to a molecular formula of $C_9H_{15}O_4$. The IR spectrum showed strong absorbantion band for hydroxy (3331 cm^{-1}) and carbonyl (1735 cm^{-1}). The 1H and ^{13}C NMR spectra of **3** showed signals assignable to two methylenes [δ_H 2.24 - 2.30 (2H, m); δ_C 30.5 (C-3); δ_H 2.09 and 2.40 (each 1H, m); δ_C 26.0 (C-4)], a methine [δ_H 4.22 (1H, t, $J = 5$ Hz); δ_C 57.1 (C-5)], and a carbonyl [δ_C 181.2 (C-6)] (Table 1 and 2). The chemical shift values and coupling patterns of these signals suggested that there was a methyl pyroglutamate moiety in **3**.¹⁹⁾ In addition, the 1H and ^{13}C NMR spectra also revealed a 2-butanol framework, with a methyls [δ_H/δ_C 1.13 (d, $J = 6$ Hz)/23.9 (Me-10)], a methylene [δ_H/δ_C 1.67 - 1.73 (m)/38.8 (C-8)], an olefinic methine [δ_H 3.79 (m); δ_C 65.5 (C-9)], and an olefinic methylene [δ_H 4.19 (dd, $J = 6, 3$ Hz); δ_C 66.0 (C-7)]. This was confirmed by 2D NMR experiments of **3**.

The 1H - 1H COSY spectrum displayed correlation between H-3 to H-4, and also H-7 to H-8, which in turn correlated with H-9, while the HMBC spectrum demonstrated correlations of C-2 with H-4 and H-3, and C-6 with H5 and H-4. Furthermore, in the HMBC spectrum strong correlation from H-7 to C-6 established that the 2-butanol moiety was located at the C-6 (Fig. 7). Therefore, the structure of **3** was deduced as 2-butanol pyroglutamate.

The 1-butanol pyroglutamate (**4**) was also colorless solid. The NMR spectra together with molecular ion at m/z 224.0893 $[M+Na]^+$ (calcd. for $C_9H_{15}O_4NNa$: 224.0893) in HR-ESI-MS indicated that **4** was closely related to **3** except for the position of hydroxyl group of butanol. The shielded of H-7 [δ_H 3.57 (1H, m)] and C-7 (δ_C 60.5) and deshielded of H-9 [δ_H 3.82 (1H, m)] and C-8 (δ_C 66.3) suggested that the hydroxyl position of butanol was changed from C-9 to C-7 in **4**. That was further supported by a correlation between the proton at δ_H 1.10 (H-10) to

carbon signal at δ_c 60.5 (C-7) and 42.6 (C-8) (Fig. 8) in the HMBC spectrum. According to the structure of **5**, so **4** was determined as 1-butanol pyroglutamate.

Osteoblasts are the most important cells in bone tissues and are critical for bone formation through proliferation and differentiation. During osteoblast differentiation, bone morphogenetic protein (BMP) induces the expression of osteoblastic markers such as alkaline phosphatase (ALP). Proliferating osteoblasts show alkaline phosphatase (ALP) activity, which is greatly enhanced during *in vitro* bone formation. ALP is a membrane bound enzyme that is often used as marker for osteogenic differentiation.²⁰⁾

To evaluate the effects of **1** – **14** on osteoblast function, ALP activity, which is related to the osteoid and initiates the deposition of minerals, was determined. In this study, it was found that **4**, **6**, **10** and **12** stimulated the ALP activity that markedly increased osteoblasts growth and differentiation in osteoblastic MC3T3-E1 cells. At concentrations of 25 μ M of **10** and **12** stimulated the ALP activity up to 112 %, compared to that of the control and stronger than the positive control, 17 β -estradiol (Fig. 9).

Osteoblasts can be induced to produce vast extracellular calcium deposits *in vitro*. This process is called mineralization. Calcium deposits are an indication of successful *in vitro* bone formation and can specifically be stained bright orange-red using Alizarin Red S. The effect of **1** – **14** were then examined by measuring the calcium deposition by Alizarin Red Staining. As was found for the ALP activity study, **4**, **6**, **10** and **12** showed stimulatory effects on mineralization. Compound **10** and **12** stimulated the mineralization to 112 %, compared to that of the control at a concentration of 25 μ M (Fig. 10).

In bone formation, osteoblasts are key cell in bone matrix formation and calcification. Osteogenesis starts with osteoblast producing and secreting type I collagen, which makes about 90% of the organic bone matrix or the osteoid. Osteoblast also become high in alkaline phosphatase, a phosphate-splitting enzyme. Alkaline phosphatase is released into the osteoid to initiate the deposit of minerals. After mineralization, the complete bone becomes hard and rigid with necessary mechanical properties to withstand the external forces to support the body and protect the internal organs. Our study demonstrates that **4**, **6**, **10** and **12** stimulated ALP activity and calcium deposition in osteoblastic MC3T3-E1 cell *in vitro*. These studies suggest that compound **4**, **6**, **10** and **12** may be able to stimulate osteoblastic bone formation and play an important role in bone remodeling.

In summary, chemical investigation of the butanol layer of methanol extract of *Spilanthes acmella* obtain fourteen compounds (**1** – **14**) including two new methyl threono lactones (**1** – **2**), and two new pyroglutamates (**3** – **4**). The isolated compounds had evaluated ALP and mineralization stimulatory activity. Our study demonstrates that **4**, **6**, **10** and **12** stimulated ALP

activity and calcium deposition in osteoblastic MC3T3-E1 cell *in vitro*. These studies suggest that compound **4**, **6**, **10** and **12** may be able to stimulate osteoblastic bone formation and play an important role in bone remodeling.

Experimental

General Experimental Procedures ^1H and ^{13}C -NMR spectra were taken on a Bruker Ultrashield 600 spectrometer at 600 MHz and 150 MHz, respectively, with TMS as an internal standard. IR and UV spectra were measured on a HORIBA FT-720 and JASCO V-520 UV/Vis spectrophotometer, respectively. Optical rotations and CD spectra were measured on a JASCO P-1030 digital polarimeter and a JASCO J-720 spectropolarimeter, respectively. Positive ion HR-ESI-MS was performed with an Applied Biosystems QSTAR XL NanoSprayTM System. Silica gel open column chromatography (CC) and reversed phase [octadecyl silylated silica gel (ODS)] CC were performed on silica gel 60 (E. Merck, Darmstadt, Germany), and Cosmosil 75C18-OPN (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan; Φ = 35 mm, L = 350 mm), respectively. HPLC was performed on an ODS column (Inertsil ODS-3, GL Science, Tokyo, Japan; Φ = 6 mm, L = 250 mm) and the eluate was monitored with a JASCO RI-930 intelligent detector and a JASCO PU-1580 intelligent pump.

Plant Material Whole plants of *Spilanthes acmella* were collected in late June 2007 in Kebun Raya Purwodadi, Malang, Indonesia, and a voucher specimen was deposited at the Department of Pharmacognosy and Phytochemistry, Faculty of Pharmacy, Airlangga University.

Extraction and Isolation The air-dried plants (2.0 kg) were extracted with methanol (10 L \times 3). The methanol solution was concentrated and adjusted to 95% aqueous methanol by the addition of water and then partitioned with *n*-hexane (1.0 L \times 3, 23.5 g). The remaining aqueous methanol layer was evaporated and re-suspended in 0.5 L of water and then partitioned with ethyl acetate (1.0 L \times 3, 40.4 g) and 1-butanol (1.0 L \times 3, 47.5 g), successively.

The 1-butanol layer (40.0 g) was proceeded on silica gel (300 g) CC with increasing amounts of MeOH in CHCl_3 [Hexane- CHCl_3 (1:1), 4l, CHCl_3 -MeOH (50:1, 40:1, 30:1, 20:1, 15:1, 10:1, 7:1, 5:1, 3:1, 2:1, 2l), 500 ml fractions being collected], yielding 19 fractions (Fr. Sab1 – Sab12). The fraction Sab11 (2.75 g) was subjected by open reversed phase (ODS) CC in 10% aq. MeOH (400 ml) – 100% MeOH (400 ml), linear gradient, lead 10 fractions (Fr. Sab11-1 – Sab11-10). The residue of fraction Sab11-3 (442 mg) and Sab11-4 (123 mg) were purified by 35% aq. MeOH of HPLC to get **1** (10.1 mg) and **8** (dendranthemoside A, 3.71 mg), respectively. The fraction Sab10 (1.81 g) was subjected by open reversed phase (ODS) CC in 10% aq. MeOH (400 ml) – 100% MeOH (400 ml), linear gradient, lead 7 fractions (Fr. Sab10-1

– Sab10-7). The residue of fraction Sab10-1 (770 mg) also was purified by HPLC, 100% aq (YMC column). Three peaks which appeared at 5, 18 and 35 minute were collected to give **2** (7.62 mg), **5** (2-*C*-methyl-*D*-threono-1,4-lactone, 9.31 mg), and **14** (uridine, 27.5 mg). The other residue of fraction Sab10-2 (193 mg) was purified by HPLC, 20% aq. MeOH to give **11** (icaraside B2, 6.12 mg) and **13** (cichoriin, 2.99 mg). The residue of fraction Sab10-3 (142 mg) was purified by HPLC, 35% aq. MeOH to give **9** (dendranthemoside B, 4.31 mg). The fraction Sab5 (710 mg) was subjected by open reversed phase (ODS) CC in 10% aq. MeOH (400 ml) – 100% MeOH (400 ml), linear gradient, lead 10 fractions (Fr. Sab5-1 – Sab5-10). The residue of fraction Sab5-1 (483 mg) and Sab5-2 (68.3 mg) were purified by HPLC, 100% aq. (YMC column) to give **3** (7.80 mg), **4** (4.21 mg) and **7** (methyl pyroglutamate, 6.63 mg), respectively. The mixture of fraction Sab6, Sab7, Sab8 and Sab9 (2.06 g) were subjected by open reversed phase (ODS) CC in 10% aq. MeOH (400 ml) – 100% MeOH (400 ml), linear gradient, lead 10 fractions (Fr. Sab6-9-1 – Sab6-9-10). The residue of fraction Sab6-9-1 (340 mg) was purified by HPLC, 100% aq. (YMC column) to give **6** (2-deoxy-*D*-ribo-1,4 lactone, 6.01 mg). The other fraction Sab6-9-4 (114 mg) was purified by HPLC, 40% aq. MeOH to give **10** (ampelosisinoside, 5.43 mg). The fraction Sab12 (5.36 g) was subjected by open reversed phase (ODS) CC in 10% aq. MeOH (400 ml) – 100% MeOH (400 ml), linear gradient, lead 10 fractions (Fr. Sab12-1 – Sab12-10). The residue of fraction Sab12-3 (129 mg) was purified by HPLC, 35% aq. MeOH to get **12** (benzyl- α -*L*-arabinopyranosyl (1 \rightarrow 6)- β -*D*-glucopyranoside, 4.51 mg).

2-*C*-methyl-*D*-threono-1,4-lactone- β -*D*-glucopyranoside (**1**)

Colorless solid; $[\alpha]_D^{26.7}$ -28.6 ($c = 0.78$, methanol); IR (film) ν_{\max} cm^{-1} : 3392, 2924, 1777, 1713, 1650, 1557, 1456, 1391, 1210, 1078, 899, 647; ^1H NMR and ^{13}C NMR, see Tables 1; positive HR-ESI-MS m/z 317.0845 $[\text{M}]^+$ (calcd. for $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{O}_9\text{Na}$: 317.0843)

2-*C*-methyl-*D*-threono-1,4-lactone- α -*D*-fructofuranoside (**2**)

Pale yellow solid; $[\alpha]_D^{26.9}$ -10.4 ($c = 0.74$, methanol); IR (film) ν_{\max} cm^{-1} : 3386, 2938, 1774, 1732, 1651, 1540, 1456, 1339, 1206, 1073, 870, 669; ^1H NMR and ^{13}C NMR, see Tables 1; positive HR-ESI-MS m/z 317.0844 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd. for $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{O}_9\text{Na}$: 317.0843).

2-butanol pyroglutamate (**3**)

Colorless solid; $[\alpha]_D^{27.7}$ -0.86 ($c = 0.42$, methanol); IR (film) ν_{\max} cm^{-1} : 3331, 2966, 2926, 1735, 1684, 1557, 1457, 1338, 1207, 1052, 670; ^1H NMR and ^{13}C NMR, see Tables 1; positive HR-ESI-MS m/z 224.0890 $[\text{M}]^+$ (calcd. for $\text{C}_9\text{H}_{15}\text{O}_4\text{NNa}$: 224.0893).

1-butanol pyroglutamate (**4**)

Colorless solid; $[\alpha]_D^{27.1} +1.40$ ($c = 0.41$, methanol); IR (film) ν_{\max} cm^{-1} : 3314, 2969, 2931, 1735, 1683, 1557, 1457, 1338, 1229, 1054, 669; ^1H NMR and ^{13}C NMR, see Tables 1; positive HR-ESI-MS m/z 224.0893 $[\text{M}]^+$ (calcd. for $\text{C}_9\text{H}_{15}\text{O}_4\text{NNa}$: 224.0893).

2-C-methyl-D-threono-1,4-lactone (**5**)¹⁶⁾

Colorless solid; $[\alpha]_D^{27.1} +1.40$ ($c = 0.41$, MeOH); IR ν_{\max} (film) cm^{-1} : 3314, 2969, 2931, 1735, 1683, 1557, 1457, 1338, 1229, 1054, 669; ^1H NMR (methanol- d_4 , δ): 1.34 (3H, s, H-6), 3.96 (1H, dd, $J = 9.3, 4.4$ Hz, H-5 α), 4.17 (1H, dd, $J = 5.5, 4.4$ Hz, H-4), 4.48 (1H, dd, $J = 9.3, 5.5$ Hz, H-5 β) and ^{13}C NMR (methanol- d_4 , δ): 17.7 (CH₃-6), 73.0 (CH₂-5), 75.7 (C-3), 76.0 (C-4), 180.2 (C-2); positive HR-ESI-MS m/z 155.0310 $[\text{M}]^+$ (calcd. for $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_4\text{Na}$: 155.0315).

2-deoxy-D-ribo-1,4 lactone (**6**)²¹⁾

Colorless solid; ^1H NMR (pyridine- d_5 , δ): 2.86 (1H, dd, $J = 18.2, 3.3$ Hz, H-3 α), 3.32 (1H, dd, $J = 18.2, 6.1$ Hz H-3 β), 4.03 (1H, dd, $J = 12.2, 3.3$ Hz, H-6 α), 4.13 (1H, dd, $J = 12.2, 3.3$ Hz, H-6 β), 4.91 (1H, dd, $J = 6.1, 3.3$ Hz, H-5), 5.00 (1H, ddd, $J = 7.2, 4.3, 2.2$ Hz, H-4) and ^{13}C NMR (pyridine- d_5 , δ): 39.9 (CH₂-3), 62.5 (CH₂-6), 69.7 (CH-4), 90.2 (CH-5), 177.5 (C-2).

Methyl pyroglutamate (**7**)²²⁾

Colorless solid; $[\alpha]_D^{27.4} -3.48$ ($c = 0.66$, MeOH); IR ν_{\max} (film) cm^{-1} : 3343, 2958, 2930, 1738, 1697, 1557, 1456, 1338, 1221, 1043, 670; ^1H NMR (methanol- d_4 , δ): 2.08 (1H, m, H-4 α), 2.25 (2H, m, H₂-3), 2.40 (1H, m, H-4 β), 3.69 (3H, s, H₃-7), 4.23 (1H, dd, $J = 12.2, 6.3$ Hz, H-5) and ^{13}C NMR (methanol- d_4 , δ): 26.0 (CH₂-4), 30.4 (CH₂-3), 53.0 (CH₃-7), 57.2 (CH-5), 174.6 (C-6), 181.2 (C-2); positive HR-ESI-MS (positive) m/z : 166.0474 $[\text{M}]^+$ (calcd. for $\text{C}_6\text{H}_9\text{O}_3\text{NNa}$: 166.0475).

Dendranthemoside A (**8**)²³⁾

Yellow powder; ^1H NMR (methanol- d_4 , δ): 0.84 (3H, d, $J = 7$ Hz, H₃-13), 0.88 (3H, s, H₃-12), 0.96 (3H, s, H₃-11), 1.24 (3H, d, $J = 7$ Hz, H₃-10), 1.49 (1H, dd, $J = 12, 7$ Hz, H-4 β), 1.56 (1H, ddd, $J = 12, 5, 2$ Hz, H-2 β), 1.67 (1H, dd, $J = 12, 7$ Hz, H-2 α), 1.82 (1H, m, H-4 α), 1.95 (1H, m, H-5), 3.13 (1H, dd, $J = 8, 7$ Hz, H-2'), 3.26 (1H, t, $J = 7$ Hz, H-5'), 3.27 (1H, t, $J = 7$ Hz, H-4'), 3.34 (1H, d, $J = 7$ Hz, H-3'), 3.65 (1H, m, H-6' α), 3.86 (1H, m, H-6' β), 3.95 (1H, m, H-3), 4.29 (1H, d, $J = 7$ Hz, H-9), 4.35 (1H, t, $J = 7$ Hz, H-1'), 5.55 (1H, dd, $J = 16, 7$ Hz, H-7), 5.73 (1H, dd, $J = 16, 7$ Hz, H-8) and ^{13}C NMR (methanol- d_4 , δ): 16.6 (CH₃-13), 24.3 (CH₃-10), 25.3 (CH₃-12), 26.0 (CH₃-11), 35.7 (CH-5), 38.3 (CH₂-4), 40.6 (C-1), 42.7 (CH₂-2), 63.0 (CH₂-6'), 69.4 (CH-9), 71.9 (CH-4'), 75.3 (CH-2'), 75.8 (CH-3), 78.0 (CH-5'), 78.2 (CH-3'), 78.4 (C-6), 102.8 (CH-1'), 133.9 (CH-7), 135.7 (CH-8); positive HR-ESI-MS m/z 337.0684 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd. for $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_6\text{Na}$: 337.0683).

Dendranthemaside B (**9**)²³⁾

Yellow powder; ¹H NMR (methanol-d₄, δ): 0.77 (3H, d, J = 7 Hz, H₃-13), 0.83 (3H, d, J = 7 Hz, H₃-11), 1.00 (3H, d, J = 7 Hz, H₃-12), 1.47 (1H, dd, J = 12, 7 Hz, H-4 β), 1.55 (1H, ddd, J = 12, 5, 2 Hz, H-2 β), 1.67 (1H, dd, J = 12, 7 Hz, H-2 α), 1.83 (1H, m, H-4 α), 2.08 (1H, m, H-5), 2.23 (3H, d, J = 7 Hz, H₃-10), 3.10 (1H, dd, J = 8, 7 Hz, H-2'), 3.23 (2H, t, J = 7 Hz, H-4', 5'), 3.30 (1H, d, J = 7 Hz, H-3'), 3.62 (1H, m, H-6' α), 3.83 (1H, m, H-6' β), 3.95 (1H, m, H-3), 4.33 (1H, t, J = 7 Hz, H-1'), 6.31 (1H, dd, J = 16, 7 Hz, H-8), 6.85 (1H, dd, J = 16, 7 Hz, H-7) and ¹³C NMR (methanol-d₄, δ): 16.6 (CH₃-13), 25.2 (CH₃-12), 26.1 (CH₃-11), 27.5 (CH₃-10), 35.5 (CH-5), 38.0 (CH₂-4), 41.1 (C-1), 42.6 (CH₂-2), 63.0 (CH₂-6'), 71.9 (CH-4'), 75.3 (CH-2'), 75.6 (CH-3), 78.0 (CH-5'), 78.2 (CH-3'), 79.2 (C-6), 102.9 (CH-1'), 131.7 (CH-8), 154.4 (CH-7), 201.0 (C-9); positive HR-ESI-MS m/z : 411.1991 [M+Na]⁺(calcd. for C₁₉H₃₂O₆Na : 411.1989).

Ampelosisiniside (**10**)²⁴⁾

Yellow powder; ¹H NMR (methanol-d₄, δ): 0.90 (3H, d, J = 6 Hz, H₃-13), 0.93 (3H, s, H₃-12), 0.99 (3H, s, H₃-11), 1.32 (3H, d, J = 6 Hz, H₃-10), 1.82 (1H, d, J = 14 Hz, H-2 β), 2.11 (1H, dd, J = 13, 2 Hz, H-4 β), 2.28 (1H, m, H-5), 2.44 (1H, t, J = 13 Hz, H-4 α), 2.87 (1H, dd, J = 14, 3 Hz, H-2 α), 3.12 (1H, t, J = 8 Hz, H-5'), 3.18 (2H, dd, J = 9, 7 Hz, H-2'), 3.29 (1H, m, H-4'), 3.35 (1H, t, J = 4 Hz, H-3'), 3.65 (1H, dd, J = 11, 5 Hz, H-6' α), 3.84 (1H, m, H-6' β), 4.35 (1H, d, J = 7 Hz, H-1'), 4.44 (1H, q, H-9), 5.73 (1H, d, J = 16 Hz, H-7), 5.91 (1H, dd, J = 16, 7 Hz, H-8) and ¹³C NMR (methanol-d₄, δ): 16.5 (CH₃-13), 21.5 (CH₃-10), 25.0 (CH₃-11), 25.4 (CH₃-12), 37.8 (CH-5), 43.9 (C-1), 46.4 (CH₂-4), 52.5 (CH₂-2), 62.7 (CH₂-6'), 71.6 (CH-4'), 75.4 (CH-2'), 77.8 (C-6, 9), 78.1 (CH-5'), 78.2 (CH-3'), 102.6 (CH-1'), 134.0 (CH-7), 134.9 (CH-8), 214.9 (C-3); positive HR-ESI-MS m/z : 411.1990 [M+Na]⁺(calcd. for C₁₉H₃₂O₆Na : 411.1989).

Icariside B2 (**11**)²⁵⁾

Colorless solid; ¹H NMR (pyridine-d₆, δ): 1.10 (3H, s, H₃-12), 1.52 (3H, s, H₃-11), 1.53 (3H, s, H₃-13), 1.67 (1H, dd, J = 12, 2 Hz, H-4 β), 2.21 (3H, s, H-10), 2.39 (1H, ddd, J = 12, 4, 2 Hz, H-2 α), 2.88 (1H, ddd, J = 12, 4, 2 Hz, H-4 α), 3.92 (1H, m, H-5'), 4.10 (1H, t, J = 8 Hz, H-2'), 4.28 (1H, t, J = 9 Hz, H-3'), 4.31 (1H, t, J = 9 Hz, H-4'), 4.42 (1H, dd, J = 12, 2 Hz, H-6' β), 4.54 (1H, dd, J = 12, 5 Hz, H-6' α), 4.98 (1H, m, H-3), 5.12 (1H, d, J = 7 Hz, H-1'), 5.91 (1H, s, H-8) and ¹³C NMR (pyridine-d₆, δ): 26.9 (CH₃-10), 29.6 (CH₃-11), 31.5 (CH₃-13), 32.4 (CH₃-12), 36.7 (C-1), 47.5 (CH₂-4), 48.5 (CH₂-2), 63.2 (CH₂-6'), 71.7 (C-5), 72.2 (CH-4'), 72.3 (CH-3), 75.8 (CH-2'), 78.8 (CH-5'), 79.1 (CH-3'), 100.9 (CH-8), 103.5 (CH-1'), 120.3 (CH-6), 198.2 (C-7), 210.1 (C-9); positive HR-ESI-MS m/z : 409.1836 [M+Na]⁺(calcd. for C₁₉H₃₀O₈Na : 409.1833).

Benzyl- α -L-arabinopyranosyl (1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside (**12**)²⁶⁾

Colorless solid; ¹H NMR (methanol-d₄, δ): 3.24 (1H, dd, J = 9, 8 Hz, H-2'), 3.28 (1H, m, H-3'), 3.29 (2H, m, H-4', 5'), 3.44 (1H, dd, J = 6, 3 Hz, H-3''), 3.46 (1H, dd, J = 8, 2 Hz, H-5'' α), 3.52 (1H, dd, J = 9, 7 Hz, H-2''), 3.68 (1H, dd, J = 12, 6 Hz, H-6' α), 3.74 (1H, m, H-4''), 3.79 (1H, dd, J = 12, 3 Hz, H-5''), 4.05 (1H, dd, J = 12, 2 Hz, H-6' β), 4.28 (1H, d, J = 7 Hz, H-1''), 4.35 (1H, d, J = 8 Hz, H-1'), 4.66 (1H, d, J = 12 Hz, H-7 α), 4.81 (1H, d, J = 12 Hz, H-7 β), 7.26 (1H, t, J = 7 Hz, H-4), 7.32 (2H, t, J = 7 Hz, H-3, 5), 7.43 (2H, d, J = 7 Hz, H-2, 6) and ¹³C NMR (methanol-d₄, δ): 66.8 (CH₂-5''), 69.6 (CH-4''), 69.7 (CH₂-6'), 71.9 (CH-4'), 72.1 (CH₂-7), 72.6 (CH-2''), 74.4 (CH-3''), 75.3 (CH-2'), 77.2 (CH-5'), 78.1 (CH-3'), 103.6 (CH-1'), 105.4 (CH-1''), 128.8 (CH-4), 129.3 (CH-2, 6), 129.4 (CH-3, 5), 139.3 (C-1). Positive HR-ESI-MS m/z : 425.1414 [M]⁺(calcd. for C₁₈H₂₆O₁₀Na : 425.1418).

Cichoriin (**13**)²⁷⁾

Colorless solid; ¹H NMR (pyridine-d₆, δ): 4.13 (1H, ddd, J = 7, 6, 2 Hz, H-3'), 4.28 (1H, d, J = 7 Hz, H-2'), 4.30 (1H, d, J = 9 Hz, H-4'), 4.36 (1H, d, J = 9 Hz, H-5'), 4.39 (1H, dd, J = 11, 5 Hz, H-6' α), 4.58 (1H, dd, J = 11, 2 Hz, H-6' β), 5.61 (1H, d, J = 8 Hz, H-1'), 6.24 (1H, d, J = 9 Hz, H-3), 7.13 (1H, s, H-8), 7.60 (1H, br s, H-4), 7.69 (1H, s, H-5) and ¹³C NMR (pyridine-d₆, δ): 62.9 (CH₂-6'), 71.7 (CH-4'), 75.4 (CH-2'), 78.9 (CH-5'), 79.7 (CH-3'), 104.7 (CH-1'), 104.9 (CH-8), 111.9 (C-10), 113.0 (CH-3), 116.9 (CH-5), 144.6 (C-7), 144.7 (C-7), 152.5 (C-6), 154.3 (C-9), 161.8 (C-2). Positive HR-ESI-MS m/z : 363.0686 [M+Na]⁺(calcd. for C₁₅H₁₆O₉Na : 363.0687).

Uridine (**14**)²⁸⁾

Yellow powder; ¹H NMR (pyridine-d₆, δ): 4.20 (1H, dd, J = 12, 2 Hz, H-5' β), 4.31 (1H, dd, J = 12, 2 Hz, H-5' α), 4.66 (1H, m, H-4'), 4.92 (2H, d, m, H-2', 3'), 5.80 (1H, d, J = 8 Hz, H-5), 6.83 (1H, d, J = 4 Hz, H-1'), 8.54 (1H, d, J = 8 Hz, H-6) and ¹³C NMR (pyridine-d₆, δ): 62.1 (CH₂-5'), 71.6 (CH-3'), 76.5 (CH-2'), 86.7 (CH-4'), 90.8 (CH-1'), 102.8 (CH-5), 141.5 (CH-6), 152.7 (C-2), 164.8 (C-4). Positive HR-ESI-MS m/z : 267.0587 [M+Na]⁺(calcd. for C₉H₁₂O₆N₂Na : 267.0587).

Acid hydrolysis to identification of sugar moiety of **1** and **2**

A solution of **1** and **2** (1 mg) in 1 N HCl (0.1 ml) were heated under conditions of reflux for 2 h. The mixture was neutralized by addition of amberlite IRA400 (OH⁻ form) and the resin was removed by filtration. Then, the filtrates were extracted with EtOAc. The aqueous layers were subjected to HPLC analysis [column: Shodex Asahipak NH 2P-50 4E, 250 x 4.6 mm i.d.; mobile phase: 75% CH₃CN in aq; detection: optical rotation (JASCO 2090Plus Chiral); flow rate: 1.0 ml/min] to identify D-fructose (**1**) and D-glucose (**2**), which were identified by

comparison of their retention times with those of authentic samples; t_R : 5.11 (D-fructose, positive optical rotation) and t_R : 6.10 (D-glucose, positive optical rotation).

Alkaline phosphatase (Alp) avticity

The cells were treated, at 90% confluence, with culture medium containing 10 mM β -glycerophosphate and 50 μ g/ml ascorbic acid, to initiate in vitro mineralization. The medium was changed every 2–3 d. After 6 days, the cells were cultured with medium containing 0.3% bovine serum and isolated compounds (**1** – **14**) individually for 3 days. On harvesting, the medium was dischared and the cell monolayer gently washed twice with phosphate buffered saline. The cells were lysed with 0.2% triton X-100, with the lysate centrifuged at 14000 x g for 5 min. The clear supernatant was used to measure ALP activity, which was determined using an ALP activity assay kit.²⁹⁾

Mineralization of MC3T3-E1

The cells were treated, at 90% confluence, with culture medium containing 10 mM β -glycerophosphate and 50 μ g/ml ascorbic acid, to initiate in vitro mineralization. After 12 days, the cells were cultured with medium containing 0.3% bovine serum and isolated compounds (**1** – **14**) individually for 2 days. On harvesting, the cells were fixed with 70% ethanol for 1 hour and then stained with 40 mM Alizarin Red S for 10 min with gentle shaking. To quantify the bound dye, the stain was solubilized with 10% cetylpyridium chloride by shaking for 15 min. The absorbance of the solubilized stain was measured at 561 nm.²⁹⁾

Acknowledgment

This work was supported by PUPT research grant of Indonesia Government. The authors are grateful for access to the superconducting NMR instrument, UV and ESI-MS at the Analytical Center of Molecular Medicine, the Analysis Center of Life Science and the Natural Science Center for Basic Research and Development of the Graduate School of Biomedical and Health Sciences, Hiroshima University.

References

- 1) Sahu J., Jain K., Jain B., and Sahu R. K., A review on phytopharmacology and micropropagation of *Spilanthes acmella*, *Pharmacologyonline newslett.*, **2**, 1105 – 1110 (2011).
- 2) Tiwari K. L., Jadhav S. K., and Joshi V., An updated review on medicinal herb genus *Spilanthes*, *Chin. J. Integr. Med.*, **9**, 1170 – 1178 (2011).

- 3) Vikas S., Jente B. U., Nagendra C., Mayank T., Bart S. U., and Vinot D., *Spilanthes acmella* ethanolic flower extract: LC-MS alkylamide profiling and its effects on sexual behavior in male rats, *Phytomedicine*, **18** (13), 1161 – 1169 (2011).
- 4) Wongsawatkul O., Prachayasittikul S., Isarankura-Na-Ayudhya C., Satayavivad J., Ruchirawat S., and Prachayasittikul V., Vasorelaxant and antioxidant activities of *Spilanthes acmella* Murr., *Int. J. Mol. Sci.*, **9**, 2724 – 2744 (2008).
- 5) Russel S. R., Andrew J. E., and Muraleedharan G. N., Bioactive N-isobutylamides from the flower buds of *Spilanthes acmella*, *Phytochemistry*, **51** (6), 729 – 732 (1999).
- 6) Storey C., and Salem J. I., Lay use of Amazonian plants for the treatment of tuberculosis, *Acta Amazonica*, **27** (3), 175 – 182 (1997).
- 7) Hossan M. S., and Hanif, B., Traditional use of medicinal plants in Bangladesh to treat urinary tract infections and sexually transmitted diseases, *Ethnobotany Research and Applications*, **8**, 61 – 74 (2010).
- 8) Shefali A., Saurabh V., and Deepak K., Phytochemical and antimicrobial studies on the leaves of *Spilanthes acmella*, *J. Chem. Pharm. Res.*, **3** (5), 145 – 150 (2011).
- 9) Jondiko I. O. J., A mosquito larvicide in *Spilanthes mauritiana*, *Phytochemistry*, **25** (10), 2289 – 2290 (1986).
- 10) Kadir H. A., Zakaria M. B., Kechil A. A., and Azirun M. S., Toxicity and electrophysiological effects of *Spilanthes acmella* Murr., *Pesticide Science*, **25** (4), 329 – 335 (1989).
- 11) Supaluk P., Saowapa S., Apilak W., Ratana L., Somsak R., and Virapong P., Bioactive metabolites from *Spilanthes acmella* Murr., *Molecules*, **4** (12), 850 – 867 (2009).
- 12) Narayana K. R., Reddy M. S., Chaluvadi M. R., and Krishna D. R., Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential, *Indian Journal of Pharmacology*, **33** (1), 2 – 16 (2001).
- 13) Retno W., Alkaline phosphatase activity of *Graptophyllum pictum* and *Sphilanthes acmella* fractions against MC3T3-E1 cells as marker of osteoblast differentiation cells, *Inter. J. Pharm. and Pharm. Sci.*, **3** (1) (2011).
- 14) David J.H., Raquel S., Kathrine V.B., Alexander C.W., Vanessa E., George W.J.F., Green aldose isomerization: 2-C-methyl-1,4-lactones from the reaction of amadori ketoses with calcium hydroxide, *Tetrahedron letters*, **48** (4), 517 – 520 (2007).
- 15) Monika A. F., Ulrich H. M., Silvia S., Adelbert B., and Meinhart H. Z., (–)-2C-Methyl-D-erythrono-1,4-lactone is formed after application of the terpenoid precursor 1-deoxy-D-xylulose, *FEBS Letters*, **437** (3), 278 – 280 (1998).

- 16) María L.U., Roberto R.G., Virginia E.S., Juana R., Caffeoylesters of threonic acid and its lactone from *Viguiera pazensis*, *The Journal of the Argentine Chemical Society*, **96** (1), 55 – 61 (2008).
- 17) Tanaka T., Nakashima T., Ueda T., Tomii K., Kouno I., Facile discrimination of aldose enantiomers by reversed-phase HPLC, *Chem. Pharm. Bull.*, **55** (6), 899–901 (2007).
- 18) Zhen Z., Dong W., Yun Z., Hong G., Ying-He H., Jin-Feng H., Fructose-derived carbohydrates from *Alisma orientalis*, *Nat. Prod. Res.* **23** (11), 1013 — 1020 (2009).
- 19) Paul B., Petra D., Caroline A. S., and Douglas W. Y., Two separate and distinct syntheses of stereospecifically deuteriated samples of (2*S*)-proline, *Org. Biomol. Chem.*, **4**, 1483 – 1491 (2006).
- 20) Stein G.S., and Lian J. B., Molecular mechanisms mediating developmental and hormone-regulated expression of genes in osteoblasts: an integrated relationship of cell growth and differentiation. In: Noda M, editor. *Cellular and molecular biology of bone*. Tokyo: academic Press., 47 – 95 (1993).
- 21) Kitajima J., Ishikawa T., Tanaka T., Ida Y., Water-soluble constituents of fennel IX. Glucides and nucleosides, *Chem. Pharm. Bull.* **47** (7), 988-992 (1999)
- 22) Paul B., Petra D., Caroline A.S., Douglas W.Y., Two separate and distinct syntheses of stereospecifically deuteriated samples of (2*S*)-proline, *Org. Biomol. Chem.* **4**, 1438 – 1491 (2006)
- 23) Otsuka H., Takeda Y., Yamasaki K., Takeda Y., Structural elucidation of Dendranthemosides A and B: Two new β -ionone glucosides from *Dendranthema shiwogiku*, *Planta Medica* **58**(4), 373 – 375 (1992).
- 24) Simona M., Nicola B., Franco Z., Angela I., Paola M., Maria I., Megastigmane and phenolic components from *Laurus nobilis* L. leaves and their inhibitory effects on nitric oxide production, *J. Agric. Food Chem.* **52**(25), 7525 – 7531 (2004).
- 25) MIYASE T., UENO A., TAKIZAWA N., KOBAYASHI H., KARASAWA H., Studies on the glycosides of *Epimedium grandiflorum* MORR. Var. *thunbergianum* (MIQ.) NAKAI. I., *Chem. Pharm. Bull.* **35**, 1109 – 1117 (1987).
- 26) Salvatore R., Alfonso G., Giuseppina T., Aliphatic and aromatic glycosides from the cell cultures of *Lycopersicon esculentum*, *Phytochemistry* **42** (4), 1031 – 1034 (1996).
- 27) *Chin. J. Nat. Med.* **7**(4) 290 – 292 (2009)
- 28) Chen H., Geng C., Cao T., Zhang X., Ma Y., Huang X., Chen J., La jiao huang tong zuo a de hua xue jie gou, *China J. Chinese Materia Medica* **38**(12), 1934 – 1937 (2013).

Table 1.The ^1H NMR spectroscopic data for compounds **1** – **4**

Position	1	2	3	4
2	-	-	-	-
3	-	-	2.24 – 2.30 (2H, m)	2.24 – 2.30 (2H, m)
4	4.43 t-like (6.5)	4.18 dd (5.5, 4.4)	2.09 (1H, m)	2.09 (1H, m)
			2.40 (1H, m)	2.40 (1H, m)
5	4.10 dd (9.5, 6.4)	3.97 dd (9.4, 4.4)	4.22(1H, t, 5)	4.16(1H, t, 6)
	4.52 dd (9.5, 6.6)	4.49 dd (9.4, 5.5)		
6	1.41 s	1.35 s	-	-
7			4.19 (2H, dd, 3, 6)	3.57 (1H, m)
8			1.67 – 1.73 (2H, m)	1.54 – 1.61 (2H, m)
9			3.79 (1H, m)	3.82 (1H, m)
10			1.13 (3H, d, 6)	1.10 (3H, d, 6)
1'	4.37 d (7.7)	3.63 d (11.9)		
		3.71 d (11.9)		
2'	3.24 dd (9.2, 7.7)	-		
3'	3.36 t-like (9.2)	4.04 d (4.2)		
4'	3.26 dd (9.8, 8.9)	3.90 dd (6.4, 4.2)		
5'	3.34 ddd (9.8, 7.4, 2.5)	3.85 ddd (6.4, 4.5, 3.0)		
6'	3.60 dd (11.6, 7.4)	3.64 dd (11.9, 5.2)		
	3.91 dd (11.6, 2.5)	3.78 dd (11.9, 3.0)		

Recorded at 600 MHz in CH_3OD . Chemical shifts (δ) are expressed in ppm

Table 2.

The ^{13}C NMR spectroscopic data for compounds **1** – **4**

Position	1	2	3	4
2	179.4	180.2	181.2	181.3
3	75.7	76.0	30.5	30.6
4	83.4	57.7	26.0	26.3
5	69.6	73.0	57.1	57.4
6	19.2	17.8	174.2	176.2
7			66.0	60.5
8			38.8	42.6
9			65.5	66.3
10			23.9	23.9
1'	104.0	60.7		
2'	74.9	109.4		
3'	78.2	82.7		
4'	72.2	79.1		
5'	78.1	84.8		
6'	63.2	63.0		

Recorded at 125 MHz in CDCl_3 . Chemical shifts (δ) are expressed in ppm.

[Bulletins of the Pharmaceutical Society of Japan <em@editorialmanager.com>](mailto:em@editorialmanager.com)

To

[Retno Widyowati](#)

Oct 18 at 8:02 PM

Dear Dr. Widyowati,

Thank you for agreeing to submit a manuscript related to for Bulletins of the Pharmaceutical Society of Japan.

The submission will be published in our issue.

You may submit your paper online at <http://cpb-bpb.edmgr.com/>. Your User Name is RetnoWidyowati and your password link: available at this link http://cpb-bpb.edmgr.com/Default.aspx?pg=accountFinder.aspx&firstname=Retno&lastname=Widyowati&email_address=retno_biotek@yahoo.com.

With kind regards

Bulletins of the Pharmaceutical Society of Japan

LAMPIRAN III. BUKTI LUARAN YANG TELAH DICAPAI

- 3. Draft artikel nasional yang akan di submit di Jurnal Bahan Alam Indonesia (Akreditasi A)**

Senyawa golongan benzopiron dan asam lemak yang diisolasi dari fraksi etil asetat dari tanaman Jotang (*Spilanthes acmella*)

Retno Widyowati^{1*}, Wiwied Ekasari¹, Neny Purwitasari¹

¹Department of Pharmacognosy and Phytochemistry, Faculty of Pharmacy, Airlangga University,

ABSTRAK

Dari hasil penelitian sebelumnya diketahui bahwa fraksi butanol dari ekstrak etanol 70% *Spilanthes acmella* mengandung senyawa golongan lakton dan iono glukosida. Beberapa dari senyawa tersebut mampu meningkatkan aktivitas enzim ALP. Pada penelitian ini telah dilakukan isolasi dan elusidasi struktur dari fraksi etil asetat dan diperoleh hasil senyawa golongan benzopiron dan asam lemak seperti asam benzene propanoate (**1**), asam 9,11-oktadekadienoat metal ester (**2**), asam tridekanoat metil ester (**3**), dan asam pentadekanoat (**4**).

Kata-kunci: *Spilanthes acmella*, benzopyran, asam lemak

PENDAHULUAN

Spilanthes acmella Murr. termasuk ke dalam famili Asteraceae, juga dikenal sebagai tumbuhan penyembuh sakit gigi, rematik dan demam, disentri, luka gigitan ular, antiseptik, antibakteri, antijamur, influenza, batuk dan stomatitis. Tumbuhan ini merupakan tanaman semak berukuran 30-60 cm. Tanaman ini merupakan tumbuhan asli daerah tropis seperti India, Brazil dan Indonesia. Bagian dari tumbuhan ini yaitu akar, batang, daun dan bunganya digunakan oleh sebagian masyarakat sebagai obat tradisional. Seperti bunganya sebagai obat gusi berdarah dan sakit gigi. Bagian yang lain seperti akar bisa digunakan sebagai obat diare. Akar, putik bunga dan bagian lainnya mengandung senyawa yang dikenal dengan nama “spilanthol” dan “acmellonate” yang merupakan stimulan yang sangat kuat dan bersifat analgesik lokal. Selain itu juga mengandung fenol, kumarin dan triterpenoid. Tumbuhan ini telah

diaplikasikan dalam bidang farmasi, anti sakit gigi, obat kumur dan obat rematik. Sebagai suplemen nutrisi sejumlah kecil ekstrak tumbuhan telah digunakan sebagai pemanis yang tidak mempengaruhi bau makanan dan minuman (Supaluk *et al.*, 2009).

Famili Asteraceae merupakan salah satu famili tumbuhan yang tersebar luas dengan 30.000 spesies dan lebih dari 1100 genus. Kebanyakan tumbuhan ini mengandung aktivitas antimikroba yang dihasilkan oleh senyawa sesquiterpen (metabolit sekunder). Selain itu Asteraceae juga mengandung senyawa kimia lain seperti polifenol dan flavonoid. Salah satu Famili Asteraceae yang sudah diteliti adalah tumbuhan Jombang (*Taraxacom Officinale* Weber et Wiggers). Herba dari tanaman ini mengandung flavonoid (isoquerin dan hyperin), taraxasterol, taraxacerin, taraxerol, taraxin, kolin, inulin, pektin, kumesterol, asparagin dan vitamin (A, B dan D). Inulin adalah oligosakarida yang mempunyai khasiat prebiotik. Akar mengandung taraxol, taraxerol, taraxin, taraxa sterol, β -amyrin, stigmasterol, β -sitosterol, kolin, levolin, pektin, inulin, kalsium, kalium, glukosa, dan fruktosa. Daun mengandung lutein, violaxantin, plaslokuinon, tanin, karotenoid, kalium, natrium, kalsium, kuper, zat besi, magnesium, fosfor, silikon, sulfur, dan vitamin (A, B1, B2, C dan D). Bunga mengandung arnidol dan flavoxantin.

Ekstrak etanol 70% tanaman ini menstimulasi aktivitas enzim alkaline fosfatase (ALP) sebesar 169% (Retno, 2010) dan meningkatkan jumlah sel osteoblas pada tulang trabekula proksimal femur pada mencit jantan sebagai model osteoporosis dengan induksi deksametason (Hening *et al.*, 2015).

METODOLOGI

Bahan

Spilanthes acmella diperoleh dari Kebun Raya, Purwodadi. Bahan kimia yang digunakan pada penelitian ini berderajat pro analisa.

Ekstraksi dan fraksinasi

Sebanyak 50 mg serbuk seluruh bagian *Spilanthes acmella* diekstraksi dengan 70% etanol dengan cara maserasi, dan maserasi diulang 3 kali. Ekstrak yang telah diperoleh dilarutkan dengan air sampai larut sempurna dan dilakukan fraksinasi dengan menggunakan pelarut heksan, etil asetat dan *n*-butanol.

Isolasi Fraksi Etil Asetat

Fraksi etil asetat yang telah diperoleh dilakukan pemisahan menggunakan kolom kromatografi dengan fase diam 300 g silika gel dan fase gerak metanol-kloroform secara gradien [hexana-kloroform (1:1), 4l, kloroform-metanol (50:1, 40:1, 30:1, 20:1, 15:1, 10:1, 7:1, 5:1, 3:1, 2:1, 2l), masing-masing 500 ml], dan fraksi yang diperoleh dipisahkan kembali menggunakan kolom kromatografi dengan fase diam ODS dan fase gerak methanol 10% – 100% secara gradien (400 ml). Kemudian fraksi tersebut dimurnikan menggunakan HPLC dengan pelarut air yang sesuai.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi dan Fraksinasi *Spilanthes acmella*

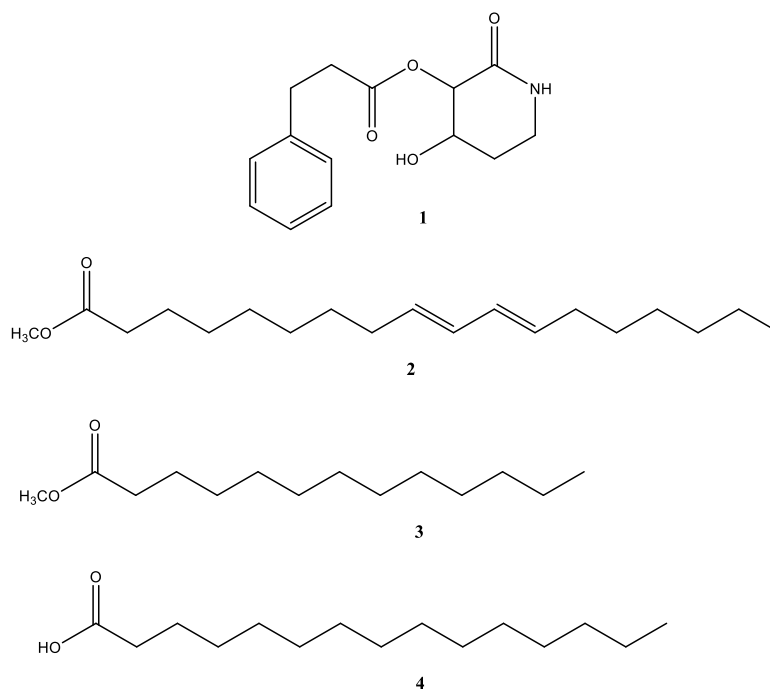
Dari 2 kg simplisia kering *Spilanthes acmella* dilakukan proses maserasi dengan menggunakan etanol 70% sebanyak 10 l selama 3 kali, dan diperoleh hasil ekstrak etanol 70% sebanyak 200 g. Dilakukan fraksinasi pada ekstrak etanol 70% berdasarkan tingkat polaritasnya yaitu dengan mencampurkan ekstrak etanol 70% dengan sedikit aquadest (100 ml) dan dilakukan pengocokan dengan heksana (1 l) dengan menggunakan corong pisah, lalu diamkan sampai terjadi pemisahan (3 kali perlakuan). Filtratnya diuapkan dengan menggunakan rotavapor dan diperoleh fraksi heksana. Residu dikocok kembali dengan etil asetat (3 kali perlakuan). Filtrat hasil pengocokan dengan etil asetat diuapkan dengan rotavapor dan diperoleh fraksi etil asetat, residunya dikocok lagi dengan butanol (3 kali perlakuan). Filtrat hasil pengocokan diuapkan dengan rotavapor dan diperoleh fraksi butanol sedangkan residunya dikeringkan dengan menggunakan *freeze dry* dan diperoleh fraksi air. Hasilnya terlihat pada tabel 1.

Tabel 1. Hasil fraksinasi dari ekstrak etanol 70% *Spilanthes acmella*

Fraksi	Banyak pelarut	Berat Fraksi
Heksana	1000 ml	23,5 g
Etil asetat	1000 ml	40,4 g
Butanol	1000 ml	47,5 g
Air	100 ml	47 g

Hasil isolasi senyawa dalam fraksi butanol *Spilanthes acmella*

Pada fraksi etil asetat (40,4 g) dilakukan pemisahan menggunakan kolom kromatografi dengan fase diam 300 g silika gel dan fase gerak metanol-kloroform secara gradien [hexana-kloroform (1:1), 4l, kloroform-metanol (50:1, 40:1, 30:1, 20:1, 15:1, 10:1, 7:1, 5:1, 3:1, 2:1, 2l), masing-masing 500 ml], dan diperoleh 19 fraksi (Sab1 – Sab12). Fraksi Sab5 (710 mg) dipisahkan kembali menggunakan kolom kromatografi dengan fase diam ODS dan fase gerak methanol 10% – 100% secara gradien (400 ml) dan diperoleh 10 fraksi (Sab5-1 – Sab5-10). Fraksi Sab5-1 (483 mg) and Sab5-2 (68,3 mg) dimurnikan menggunakan HPLC dengan pelarut air dan diperoleh senyawa **1** (7,80 mg). Fraksi Sab10 (1,81 g) dipisahkan juga menggunakan kolom kromatografi dengan fase diam ODS dan fase gerak metanol 10% – 100% secara gradien (400 ml) diperoleh 7 fraksi (Sab10-1 – Sab10-7). Pada fraksi Sab10-1 (770 mg) dimurnikan menggunakan HPLC kolom YMC dengan pelarut air dan diperoleh senyawa **2** (2-C-metil-D-treono-1,4-lakton) sebanyak 9,31 mg pada menit ke 18. Sab10-2 (193 mg) dimurnikan menggunakan HPLC dengan pelarut metanol 20% diperoleh senyawa **4** (ikarisida B2, 6,12 mg). Fraksi Sab10-3 (142 mg) juga dipisahkan menggunakan HPLC dengan pelarut metanol 35% dan diperoleh hasil **3** (dendrantemosida B, 4,31 mg) (gambar 5.3).



Gambar 1. Struktur dari senyawa dalam fraksi etil asetat *Spilanthes acmella*

KESIMPULAN

Fraksi etil asetat dari *Spilanthus acmella* mengandung senyawa golongan benzopiron dan asam lemak seperti asam benzene propanoate (1), asam 9,11-oktadekadienoat metal ester (2), asam tridekanoat metil ester (3), dan asam pentadekanoat (4).

UCAPAN TERIMA KASIH

Saya mengucapkan terima kasih kepada DRPM Dikti dan ketua LPI Unair yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk melakukan penelitian PUPT 2017 ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Harbome, J.B., 1987. *Metode Fitokimia, Penentuan Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Terbitan Kedua, ITB, Bandung.
- Laswati, H.P., 2007, Kombinasi Latihan Fisik dan Pemberian Daun Semanggi Menghambat Peningkatan Ketidakseimbangan Proses Remodeling Tulang Perempuan Pascamenopause melalui Peran Reseptor Estrogen a Sel Osteoblas. *Disertasi*, Program Pascasarjana Universitas Airlangga.
- Laswati H.P, Imam S., Retno W., Mangestuti A., Jahya A.P., 2015. *Spilanthus acmella* and Physical Exercise Increased Testosterone Levels and Osteoblast Cells in Glucocorticoid Induced Osteoporosis Male Mice. *Bali Medical Journal* 4 (2), 76–81.
- Pramono, S., 2007. *Jamu in Indonesian daily life and industry*. Institute of natural medicine, University of Toyama, p 1.
- Retno W., Yasuhiro T., Tatsurou M., Suresh A., Shigetoshi K., 2010. Alkaline Phosphatase (ALP) Enhancing Iridoid Glucosides from The Indonesian Medicinal Plant *Barleria lupulina*. *Natural Product Communication* 5 (11), 1711–1716.
- Retno W., 2010. Alkaline Phosphatase Activity of *Graptophyllum pictum* and *Sphilanthus acmella* Fractions againts MC3T3-E1 Cells as Marker of Osteoblast Differentiation Cells. *Intern. J. Pharm. & Pharm. Sci.* 3 (1), 34–37.
- Retno W., Mangestuti A., Laswati H., 2012. Efek Pemberian Ekstrak Etanol 70% *Barleria lupulina* dan Kombinasi Latihan Fisik pada Mencit yang Diinduksi Deksametason. *Jurnal Bahan Alam Indonesia* 8 (1), 58–61

Supaluk P., Saowapa S., Apilak W., Ratana L., Somsak R., and Virapong P., 2009.
Bioactive metabolites from *Spilanthes acmella* Murr, *Molecules*, 4 (12), 850–867.

LAMPIRAN IV. BUKTI LUARAN YANG TELAH DICAPAI

4. Draft Paten

Deskripsi

FRAKSI AKTIF DARI *SPILANTHES ACMELLA* DALAM PENINGKATAN FORMASI TULANG

Bidang Teknik invensi

Invensi yang berhubungan dengan proses fraksinasi dari tanaman *Spilanthes acmella* secara *bioactive guide fractionation*, dimana ekstrak tanaman tersebut dilakukan pemisahan berdasarkan keaktifan dari masing-masing pelarut yang dimulai dari tingkat kepolaran yang rendah ke tinggi.

Latar Belakang Invensi

Spilanthes acmella Murr. termasuk ke dalam famili Asteraceae, juga dikenal sebagai tumbuhan penyembuh sakit gigi, rematik dan demam, disentri, luka gigitan ular, antiseptik, antibakteri, antijamur, influenza, batuk dan stomatitis. Tumbuhan ini merupakan tanaman semak berukuran 30-60 cm. Tanaman ini merupakan tumbuhan asli daerah tropis seperti India, Brazil dan Indonesia. Bagian dari tumbuhan ini yaitu akar, batang, daun dan bunganya digunakan oleh sebagian masyarakat sebagai obat tradisional. Seperti bunganya sebagai obat gusi berdarah dan sakit gigi. Bagian yang lain seperti akar bisa digunakan sebagai obat diare. Akar, putik bunga dan bagian lainnya mengandung senyawa yang dikenal dengan nama “spilanthol” dan “acmellonate” yang merupakan stimulan yang sangat kuat dan bersifat analgesik lokal. Selain itu juga mengandung fenol, kumarin dan triterpenoid. Tumbuhan ini telah diaplikasikan dalam bidang farmasi, anti sakit gigi, obat kumur dan obat rematik. Sebagai suplemen nutrisi sejumlah kecil ekstrak tumbuhan telah digunakan sebagai pemanis yang tidak mempengaruhi bau makanan dan minuman. Herba dari tanaman ini mengandung flavonoid (isoquerin dan hyperin), taraxasterol, taraxacerin, taraxerol, taraxin, kolin, inulin, pektin, kumesterol, asparagin dan vitamin (A, B dan D). Inulin

adalah oligosakarida yang mempunyai khasiat prebiotik. Akar mengandung taraxol, taraxerol, taraxin, taraxa sterol, β -amyrin, stigmasterol, β -sitosterol, kolin, levolin, pektin, inulin, kalsium, kalium, glukosa, dan fruktosa. Daun mengandung lutein, violaxantin, plaslokuinon, tanin, karotenoid, kalium, natrium, kalsium, kuper, zat besi, magnesium, fosfor, silikon, sulfur, dan vitamin (A, B1, B2, C dan D). Bunga mengandung arnidol dan flavoxantin.

Ekstrak etanol 70% tanaman ini menstimulasi aktivitas enzim alkaline fosfatase (ALP) sebesar 169% dan meningkatkan jumlah sel osteoblas pada tulang trabekula proksimal femur pada mencit jantan sebagai model osteoporosis dengan induksi deksametason. Kemudian perlunya dilanjutkan penelitian terhadap keaktifan dari masing-masing fraksi berdasarkan tingkat kelarutan atau kepolarannya.

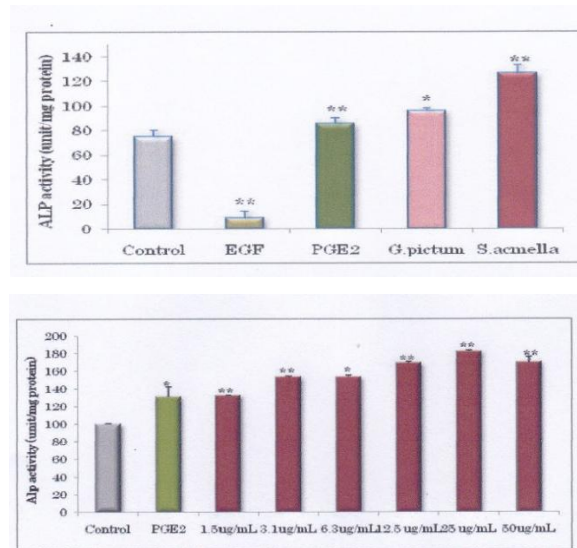
Uraian Singkat Invensi

Tujuan dari invensi ini adalah untuk mendapatkan fraksi aktif yang mampu meningkatkan aktivitas enzim alkaline fosfatase (ALP) sehingga mampu meningkatkan formasi tulang. Aspek utama dari invensi ini adalah diperoleh fraksi aktif yang mampu meningkatkan formasi tulang.

Uraian Lengkap Invensi

Spilanthes acmella diperoleh dari Kebun Raya Purwodadi, Jawa Timur, Indonesia. Seluruh bagian tanaman kering dihaluskan sampai terbentuk serbuk dan diekstraksi dengan menggunakan etanol 70%. Penguapan etanol dilakukan dengan menggunakan *rotary evaporator* dan *freeze dry*. Ekstrak yang sudah kering, ditimbang beratnya dan disimpan dalam eksikator. Ekstrak tersebut telah dilakukan uji aktivitas anti-osteoporosis *in vitro* dan *in vivo* serta kombinasi latihan fisik.

Ekstrak etanol 70% dari *Spilanthes acmella* mampu meningkatkan aktivitas enzim ALP sebesar 169% terhadap sel osteoblast MC3T3-E1 pada konsentrasi 50 $\mu\text{g/mL}$. Kemudian dilakukan pengujian pada beberapa dosis ekstrak dan diperoleh hasil bahwa ekstrak tersebut mempunyai aktivitas peningkatan terhadap enzim ALP berdasarkan peningkatan dosis sampai dengan konsentrasi 25 $\mu\text{g/mL}$.

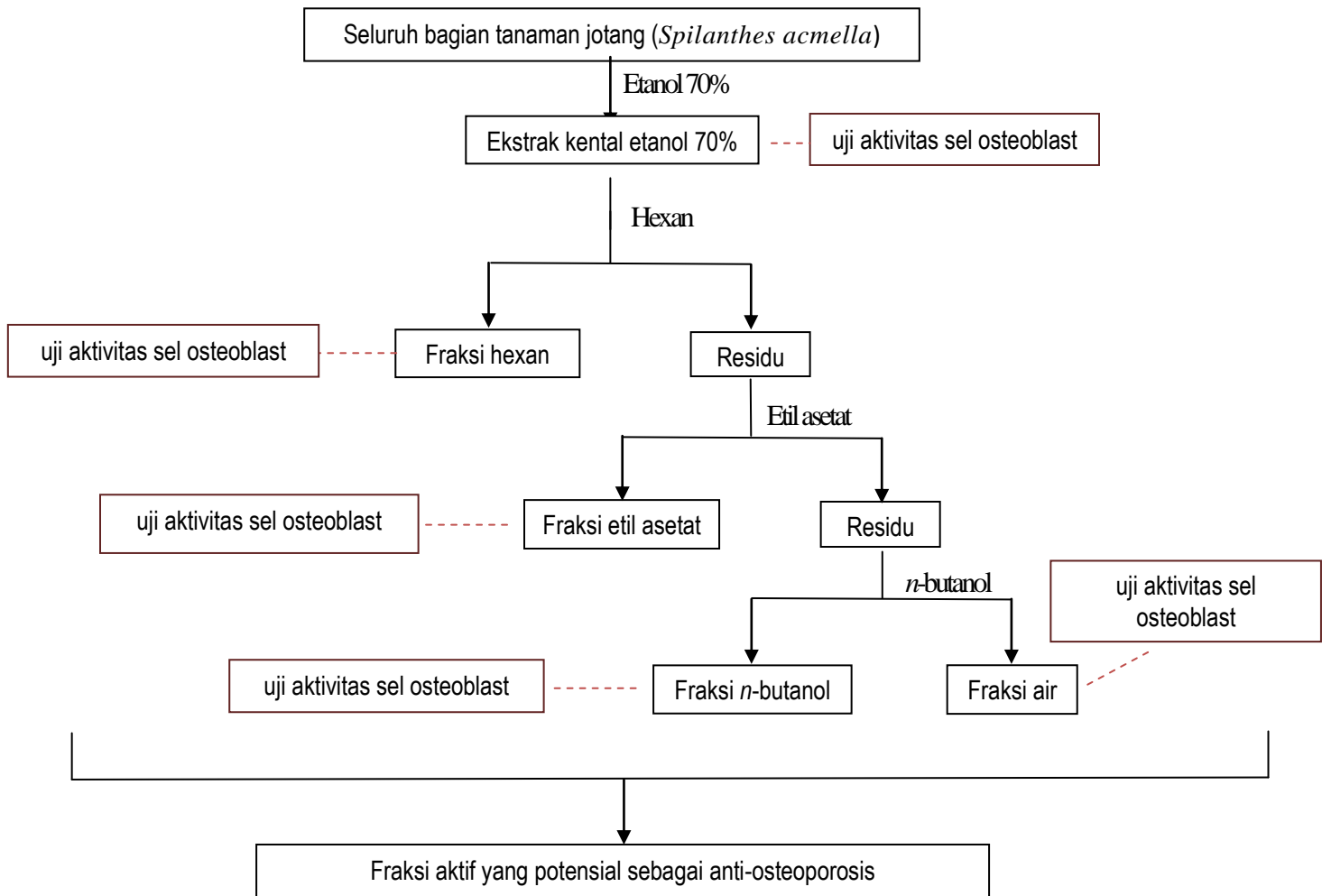


Ekstrak etanol 70% pada aktivitas ALP dari sel osteoblas MC3T3-E1 menunjukkan bahwa ekstrak tersebut memiliki efek bifasitik, dimana pada konsentrasi rendah, mampu merangsang aktivitas ALP. Feng pernah melaporkan pada sampel yang berbeda yaitu enterolakton dan enterodiol memiliki efek bifasik terhadap kelangsungan hidup dan aktivitas ALP dari sel MG-63 dan sintesis DNA pada sel MCF-7 (sel kanker payudara). Pada konsentrasi yang relatif rendah, beberapa fitoestrogen mengekspresikan aktivitas estrogenik dan merangsang pertumbuhan sel, sementara pada konsentrasi yang lebih tinggi fitoestrogen yang sama tampaknya antiestrogenik dan menekan pertumbuhan sel. Cara kerja bifasik dapat mewakili terapi anabolik yang tepat untuk osteoporosis.

Ekstrak etanol 70% yang telah diperoleh dilarutkan dengan air sampai larut sempurna dan dilakukan fraksinasi dengan menggunakan pelarut heksan, etil asetat dan *n*-butanol. Dari 2 kg simplisia kering *Spilanthes acmella* dilakukan proses maserasi dengan menggunakan etanol 70% sebanyak 10 l selama 3 kali, dan diperoleh hasil ekstrak etanol 70% sebanyak 200 g. Dilakukan fraksinasi pada ekstrak etanol 70% berdasarkan tingkat polaritasnya yaitu dengan mencampurkan ekstrak etanol 70% dengan sedikit aquadest (100 ml) dan dilakukan pengocokan dengan heksana (11) dengan menggunakan corong pisah, lalu diamkan sampai terjadi pemisahan (3 kali perlakuan). Filtratnya diuapkan dengan menggunakan rotavapor dan diperoleh fraksi heksana. Residu dikocok kembali dengan etil asetat (3 kali perlakuan). Filtrat hasil pengocokan dengan etil asetat diuapkan dengan rotavapor dan diperoleh fraksi etil asetat, residunya dikocok lagi dengan butanol (3 kali perlakuan). Filtrat hasil

pengocokan diuapkan dengan rotavapor dan diperoleh fraksi butanol sedangkan residunya dikeringkan dengan menggunakan *freeze dry* dan diperoleh fraksi air. Hasil ekstraksi dan fraksinasi terlihat pada table dibawah ini:

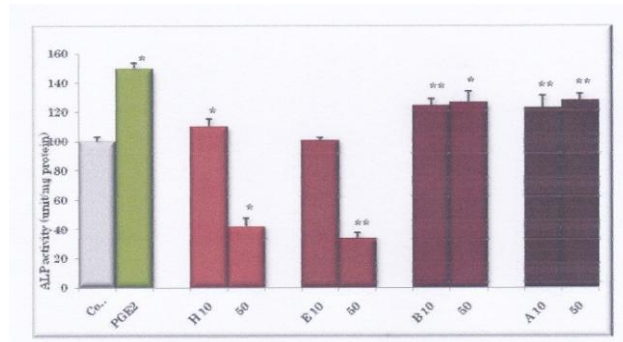
Tahapan proses ekstraksi dan fraksinasi atau pemisahan pada tanaman *Spilanthes acmella* ini dilakukan seperti pada bagan dibawah ini:



Fraksi	Banyak pelarut	Berat Fraksi
Heksana	1000 ml	23,5 g
Etil asetat	1000 ml	40,4 g
Butanol	1000 ml	47,5 g
Air	100 ml	47 g

Masing-masing fraksi dilakukan uji aktivitas anti-osteoporosis *in vivo* dengan mengukur ketebalan tulang trabekula dari tulang femur mencit. Sel yang 90% bergerombol dikultur dengan menggunakan medium α -MEM yang mengandung 10 mM β -glycerofosfate and 50 μ g/ml asam askorbat. Medium diganti setiap 2–3 hari, setelah 6

hari sel dikultur dengan medium yang mengandung 0.3% serum bovin and sampel selama 3 hari. Kemudian medium dibuang dan sel dicuci dengan menggunakan buffer fosfat salin sebanyak 3 kali. Sel dilisis dengan 0.2% triton X-100 dan disentrifuse pada 14000 x g selama 5 menit. Supernatan yang jernih digunakan untuk mengukur ALP dengan bantuan ALP assay kit.



Diantara fraksi heksana, etil asetat, n-butanol dan fraksi air dari *Spilanthus acmella*, fraksi n-butanol dan air mampu meningkatkan aktivitas ALP sebesar 126% dan 127%, namun heksana dan etil asetat tidak menunjukkan aktivitasnya.

Klaim

Suatu fraksi aktif yaitu fraksi butanol yang mampu meningkatkan aktifitas enzim alkaline fosfatase pada sel MC3T3-E1 osteoblas sehingga mampu meningkatkan formasi dari tulang.

Abstrak

FRAKSI AKTIF DARI *SPILANTHES ACMELLA* DALAM PENINGKATAN FORMASI TULANG

Telah dihasilkan invensi berupa fraksi aktif yait fraksi butanol dari tanaman *Spilantes acmella* yang diperoleh dari hasil pemisahan atau fraksinasi ekstrak etanol 70% dengan menggunakan pelarut pemisahan bertingkat dari heksana, etil asetat dan terakhir butanol. Fraksi aktif ini (fraksi butanol) diaplikasikan terhadap peningkatan enzim alkaline fosfatase pada sel MC3T3-E1 osteoblas. Penelitian ini merupakan marker penanda untuk peningkatan formasi tulang. Jadi fraksi butano mapu meningkatkan formasi dari tulang.